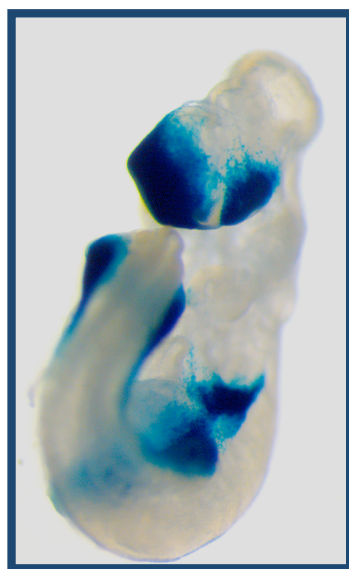


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN
HOMEODOMINIO *ALX3* Y SUS IMPLICACIONES
EN LA GENERACIÓN DE MALFORMACIONES
CONGÉNITAS ASOCIADAS A LA EMBRIOPATÍA
DIABÉTICA**



Patricia García Sanz

Madrid
2011

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN
HOMEODOMINIO *ALX3* Y SUS IMPLICACIONES
EN LA GENERACIÓN DE MALFORMACIONES
CONGÉNITAS ASOCIADAS A LA EMBRIOPATÍA
DIABÉTICA

Patricia García Sanz
Licenciada en Biología

Director:
Dr. Mario Vallejo Fernández de la Reguera

Instituto de investigaciones Biomédicas de Madrid “Alberto Sols”
Consejo Superior de Investigaciones Científicas/UAM
2011

Esta tesis doctoral se ha realizado gracias al disfrute de una beca predoctoral asociada al proyecto “Mecanismos transcripcionales de regulación del cierre del tubo neural durante el desarrollo embrionario” (referencia BFU2005-02052) concedido al Dr. Mario Vallejo Fernández de la Reguera y financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS.

Muchas son las personas a las que agradezco el haber hecho posible, de una manera u otra, la realización de esta tesis doctoral, espero no olvidarme de ninguna.

En primer lugar, quiero dar las gracias al Dr. Mario Vallejo por darme la oportunidad de incorporarme a su laboratorio y confiar en mí para realizar este proyecto. Gracias a su dedicación, paciencia y consejos han posibilitado que haya podido terminar este trabajo. No cabe duda que estos cuatro años a su lado han sido para mí una importante etapa de crecimiento personal y profesional que le agradezco sinceramente.

Al Dr. Eduardo Domínguez le debo la oportunidad de introducirme en la investigación e ilusionarme con la idea de hacer una tesis gracias a permitirme formar parte de su proyecto en la Universidad Pablo Olavide. Me gustaría también dar las gracias a al Dr. José María García Delgado por acogerme en su laboratorio y grupo en aquel período tan incierto para mi futuro. De aquella etapa guardo un buen recuerdo y me gustaría también dar las gracias a Magda, Ángela, Rocío y Ángel por todo su apoyo mostrado.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, a todos los que han formado parte del 0.3. Quería agradecer a los servicios del IIb por su trabajo.

Esta tesis la quiero dedicar con todo mi cariño a mi familia. A mi hermano y en especial a mis padres, Encarni y Robus. Para ellos no tengo palabras suficientes que reflejen la gratitud, el respeto y el amor que siento hacia ellos. Sin ellos no hubiera conseguido llegar hasta aquí. No me quiero olvidar de todos mis tíos y tías, gracias por el interés mostrado a lo largo de estos años. En especial quiero darle las gracias a mi tía Mari Tere que me acogió incondicionalmente en su casa al principios de esta etapa y por su interés y preocupación por mí. Y como no a mi tía Julita, siempre preocupada y con u

Por último, a Luis. Sin tu apoyo no hubiera podido llegar hasta aquí. Gracias por ser como eres.

Resumen



RESUMEN

Alx3 es un gen tipo homeodominio de la familia *aristaless* que se expresa durante el desarrollo en mesénquima craneal y participa en la regulación del cierre del tubo neural. Una proporción de los embriones de ratón deficientes en *Alx3*, muestran un defecto en el cierre de esta estructura durante el desarrollo embrionario. En la presente tesis hemos demostrado que este defecto se asocia a un incremento en el número de células apoptóticas en la región anterior del mesénquima craneofacial que contribuye a que exista una disminución significativa de la densidad celular. La administración de ácido fólico durante el periodo periconcepcional disminuye la incidencia de este tipo de malformaciones congénitas, pero se desconoce el mecanismo por el cual ejerce este efecto. Los resultados de esta tesis demuestran que la expresión de *Alx3* también es dependiente de la disponibilidad del ácido fólico *in vivo*.

Hemos iniciado estudios diseñados para identificar elementos reguladores en el promotor de *Alx3* que participan en el control de su expresión. Estos estudios han conducido al descubrimiento de elementos que reconocen factores de transcripción de tipo bHLH. Hemos demostrado que los factores de transcripción Twist, E47, USF1 y USF2 cooperan en la regulación transcripcional del gen *Alx3* a través de su unión a dos cajas E situadas en la región proximal del promotor.

Por otro lado, en esta tesis hemos demostrado que la deficiencia de *Alx3* constituye un factor de riesgo para la aparición de malformaciones congénitas durante hiperglucemia gestacional. *Alx3* participa en los mecanismos de defensa frente el estrés oxidativo alterados durante la embriopatía diabética. El incremento de la vulnerabilidad embrionaria a la hiperglucemia de origen materno como consecuencia de la carencia de *Alx3* se asocia a un déficit relativo de la expresión de genes que codifican factores de transcripción y moléculas de señalización extracelulares importantes para el desarrollo embrionario. Además, la expresión de *Alx3* es necesaria para que el ácido fólico lleve a cabo su papel protector contra la aparición de malformaciones congénitas asociadas a la hiperglucemia gestacional. Ello indica que *Alx3* forma parte del mecanismo de acción de esta vitamina.

Summary



SUMMARY

Alx3 is a homeodomain transcription factor that belongs to a subfamily of proteins characterized by the presence of an *aristaless* domain. During embryonic development it is expressed in the cranial mesenchyme and is involved in the mechanisms that regulate the closure of the cranial neural tube. A proportion of *Alx3* deficient mouse embryos exhibit cranial neural tube closure defects. The present study demonstrates that this defect is associated with an increase in the number of apoptotic cells in the craniofacial mesenchyme leading to a decrease in cellular density.

It is known that the periconceptional administration of folic acid reduces the incidence of congenital malformations, but the mechanisms responsible for this preventive effect remain unknown. Results described in this thesis show that *Alx3* gene expression is specifically dependent on the availability of adequate levels of folic acid *in vivo*.

Studies have been carried out in order to identify regulatory elements in the *Alx3* promoter involved in the control of its expression. These studies led to the finding of elements that bind bHLH transcription factors. We demonstrated that the transcription factors Twist, E47, USF1 and USF2 cooperate in the transcriptional regulation of *Alx3* through their binding to two E boxes located in the proximal promoter.

On the other hand, we demonstrate that *Alx3* deficiency increases the risk of embryonic malformations in gestational diabetes. *Alx3* is involved in the defence mechanisms against oxidative stress that are affected in diabetic embryopathy. The increase in the embryonic vulnerability to maternal hyperglycaemia due to lack of *Alx3* is associated with a relative deficit in the expression of genes encoding transcription factors and extracellular signalling molecules that are important during embryonic development.

Furthermore, we observed that the expression of *Alx3* is required for the protective effect of folic acid reducing the incidence of embryonic malformations induced by hyperglycaemia, indicating that *Alx3* is part of the mechanism of action of this vitamin.

Índice



ABREVIATURAS.....	4
1. INTRODUCCIÓN.	
1.1. <i>Alx3</i>.	
1.1.1. Identificación: Familia de Homeodominios <i>Aristaless</i>	5
1.1.2. Patrón de expresión.....	6
1.1.3. Funciones.....	7
1.1.4. Regulación de <i>Alx3</i> por ácido fólico.....	8
1.2. Diabetes y desarrollo embrionario.	
1.2.1. Malformaciones congénitas asociadas a la diabetes durante el embarazo.....	10
1.2.2. Bases moleculares de la embriopatía diabética.....	11
1.3. Factores de transcripción bHLH.	
1.3.1. Características generales y clasificación.....	13
1.3.2. Twist.	
1.3.2.1. Características generales.....	16
1.3.2.2. Patrón de expresión y funciones durante el desarrollo.....	17
1.3.2.3. Twist como posible regulador de la expresión de <i>Alx3</i>	19
1.3.3. USF.	
1.3.3.1. Identificación y características.....	20
1.3.3.2. Patrón de expresión y funciones.....	22
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	
3.1. Cultivos celulares.	
3.1.1. RC2.E10.....	25
3.1.2. Hela, NIH3T3 y Min6.....	25
3.2. Plásmidos.	
3.2.1. Construcciones con fragmentos de la región 5' de <i>Alx3</i>	25
3.2.2. Vectores de expresión en células eucariotas.....	27

3.3. Mutagénesis dirigida.....	28
3.4. Transfecciones transitorias y ensayo de actividad luciferasa.....	28
3.5. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética en gel (EMSA).....	29
3.6. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	30
3.7. RT-PCR en células RC2.E10.....	31
3.8. Animales.	
3.8.1. Dietas.....	32
3.8.2. Test de tolerancia a la glucosa (GTT).....	33
3.8.3. Inducción de hiperglucemia gestacional.....	33
3.9. RT-PCR cuantitativa en embriones de ratón.....	34
3.10. Hibridación <i>in situ</i> en embriones de ratón.	35
3.11. Tinción de β-galactosidasa.....	36
3.12. Ensayo TUNEL e histología.....	37
 4. RESULTADOS.	
 4.1. <i>Alx3</i> y desarrollo craneal.	
4.1.1. La carencia de <i>Alx3</i> no altera la expresión de genes importantes para el desarrollo craneofacial.....	38
4.1.2. La carencia de <i>Alx3</i> incrementa la apoptosis en la región craneofacial....	39
4.1.3. La expresión de <i>Alx3</i> depende de la disponibilidad de ácido fólico <i>in vivo</i>	41
4.2. Regulación transcripcional de la expresión de <i>Alx3</i>.	
4.2.1. Análisis funcional de regiones reguladoras del promotor de <i>Alx3</i>	42
4.2.2. Regulación transcripcional de <i>Alx3</i> por Twist.....	45
4.4.3. Regulación transcripcional de <i>Alx3</i> por USF1 y USF2.....	50
4.3. <i>Alx3</i> y embriopatía diabética.	
4.3.1. La carencia de <i>Alx3</i> no empeora la tolerancia a la glucosa durante la gestación.....	54
4.3.2. Malformaciones inducidas por hiperglucemia en embriones <i>Alx3</i> ^{-/-}	55
4.3.3. La deficiencia de <i>Alx3</i> limita el incremento de la expresión de enzimas y factores de transcripción que protegen frente al estrés oxidativo.....	57

4.3.4. <i>Alx3</i> es necesario para la expresión de genes que regulan el desarrollo embrionario durante la hiperglucemia gestacional.....	58
4.3.5. La expresión de <i>Alx3</i> es necesaria para el efecto protector del ácido fólico en la embriopatía diabética.....	60
5. DISCUSIÓN.	
5.1. La expresión de <i>Alx3</i> depende de la disponibilidad de ácido fólico <i>in vivo</i> ...	63
5.2. <i>Alx3</i> es necesario para la supervivencia celular durante el desarrollo de la región craneofacial.....	64
5.3. Regulación de la expresión de <i>Alx3</i> por ácido fólico.....	65
5.4. Twist, USF1 y USF2 cooperan en la regulación transcripcional de <i>Alx3</i>	66
5.5. <i>Alx3</i> y malformaciones congénitas asociadas a hiperglucemia.....	69
6. CONCLUSIONES.....	75
7. BIBLIOGRAFÍA.....	76
8. ANEXO I: <i>Publicaciones derivadas de la Tesis</i>.....	97

Abreviaturas

ABREVIATURAS

bHLH:	Factor de transcripción básico hélice-lazo-hélice.
BMP:	Proteína morfogenética de hueso (Bone morphogenetic protein)
DNMT3a:	DNA metiltransferasa 3a
EMSA:	Ensayo de retardo de la movilidad electroforética
Folbp1:	Receptor de folato 1 (Folate binding protein)
FoxO:	Forkhead Homeobox type O
Gpx-1:	Glutación peroxidasa 1
Hif1α:	Factor Inducible por Hipoxia-1 α
MnSOD:	Manganeso superóxido dismutasa
NOS:	Óxido nítrico sintetasa
PDGFRα:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas α (platelet derived growth factor receptor)
VEGF-1 :	Factor del crecimiento del endotelio vascular (Vascular endothelial growth factor)

Introducción



1. INTRODUCCIÓN.

1.1. *Alx3*.

1.1.1. Identificación: Familia de Homeodominios *Aristaless*.

Alx3 es un factor de transcripción de tipo homeodominio de la clase *paired*. Los factores de transcripción homeodominio se caracterizan por la presencia de un dominio de unión al DNA de 60 aminoácidos con una secuencia muy conservada entre especies que da nombre a la familia. Un homeodominio consta de tres hélices α , dos de ellas (la 2 y la 3) en conformación *Hélice-giro-Hélice* conectadas entre si por una región en forma de asa. La hélice 3, denominada de reconocimiento, interacciona con el surco mayor del DNA, aunque se han observado también interacciones entre el lazo que precede al motivo *Hélice-giro-Hélice* y el DNA. El extremo amino terminal flexible de la hélice 1 contacta con las bases del DNA a través del surco menor (Gehring et al., 1994; Wolberger, 1996) (Figura 1A y B).

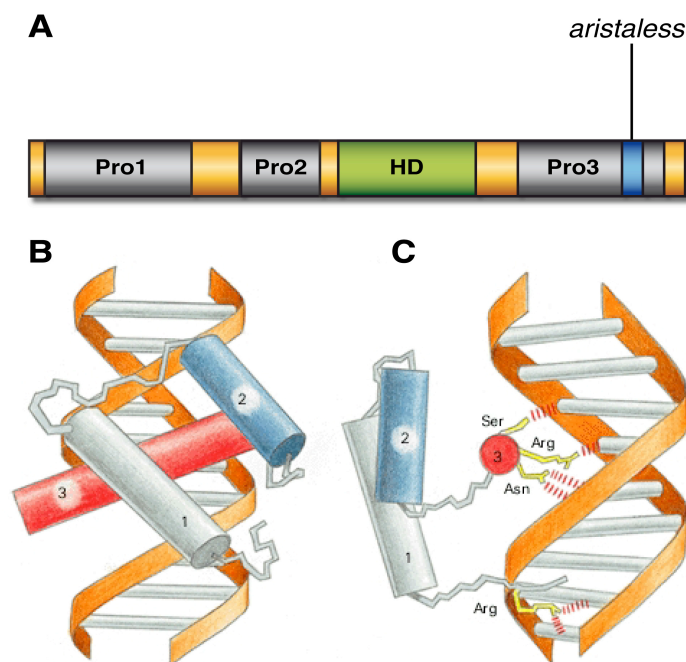


Figura 1. Representación de un homeodominio unido al DNA. A, Representación esquemática de los dominios funcionales del factor de transcripción *Alx3*. En gris se representan tres dominios ricos en prolina (*Pro1*, *Pro2*, y *Pro3*), el homeodominio (*HD*) en verde y el dominio OAR en azul. Adaptado de Pérez-Villamil et al. (2004). B, Unión de un homeodominio a una secuencia específica de DNA. C, La hélice de reconocimiento (roja) posee unos nueve aminoácidos con cadenas laterales que pueden establecer puentes de hidrógeno con bases específicas en el surco mayor. La hélice 2 (azul) no interacciona directamente con el DNA, pero estabiliza la unión de la hélice 3 al DNA a través de interacciones hidrofóbicas. El brazo flexible unido a la hélice 1 (blanca) se une al surco menor del DNA. Adaptado de Gehring et al. (1994).

El grado de similitud de la secuencia de los homeodominios proporciona las bases para clasificar a estos factores en diferentes clases. La clase *paired* está constituida por un grupo de factores de transcripción codificados por genes que desempeñan funciones importantes durante el desarrollo embrionario. Las proteínas de esta clase se caracterizan por la presencia de un homeodominio homólogo al codificado por el gen *paired* de *Drosophila*. Estas proteínas se unen al DNA de manera óptima formando homo o heterodímeros que reconocen elementos específicos cuya secuencia está constituida por dos motivos 5'-TAAT-3' separados por tres nucleótidos (TAATNNNATTA) (Wilson et al., 1993; Qu et al., 1999; Tucker y Wisdom, 1999). Dentro de la clase *paired*, *Alx3* se incluye en un subgrupo de factores de transcripción caracterizados por la presencia en la región carboxi-terminal de un dominio conservado conocido como OAR o dominio *aristaless* (Figura 1C). Este grupo incluye los factores *Prx1* y *Prx2* (ten Berge et al., 1998; Lu et al., 1999), *Alx3* (ten Berge et al., 1998), *Alx4* (Qu et al., 1998) y *Cart1* (Zhao et al., 1993).

1.1.2. Patrón de expresión.

Los genes de la familia *aristaless* exhiben patrones de expresión superpuestos durante el desarrollo embrionario en regiones que incluyen el mesénquima craneal derivado de la cresta neural, los arcos branquiales, el mesodermo lateral y el primordio de las extremidades. En embriones de ratón *Alx3* se expresa a partir del día 8 de gestación (E8.0). En este estadio también se expresa en la región próxima al primordio de la cola y en la membrana alantoidea (ten Berge et al., 1998), estructura crítica para el desarrollo temprano (Inman y Downs, 2007).

Entre E9.0 y E9.5 se observa un marcado cambio en el patrón de expresión de *Alx3*, que en este estadio del desarrollo embrionario se localiza de manera predominante en el mesénquima cefálico anterior, en áreas del mesodermo lateral y en la pared abdominal (ten Berge et al., 1998).

En la región craneofacial, en E9.5, *Alx3* muestra una marcada expresión en el mesénquima del proceso frontonasal subyacente a las placodas olfatorias. Posteriormente, entre E10.5 y E11.0 se expresa en las regiones lateral y medial del mesénquima del proceso nasal. Desde E9.5 a E11.0, se detecta su expresión en el arco mandibular distal y en la pared abdominal. Posteriormente, en los días E12.5-E14.5,

en el mesénquima derivado de la cresta neural en el proceso nasal, en ambas mandíbulas en desarrollo y en la parte distal de la lengua (ten Berge et al., 1998; Manley et al., 2001).

A partir de E9.5, *Alx3* se expresa en el mesénquima del primordio de las extremidades, que en este estadio ya han comenzado a formarse.

1.1.3. Funciones.

Se ha podido demostrar que los genes de la familia *aristaless* regulan procesos importantes durante el desarrollo embrionario. En concreto, *Alx3*, *Alx4* y *Cart1* están altamente relacionados entre sí y, de hecho, comparten ciertas funciones durante la morfogénesis en el ratón.

Alx3 está implicado en el desarrollo de estructuras óseas craneofaciales. En humanos se han descrito mutaciones del gen *ALX3* como la causa de una displasia frontonasal de tipo 1 denominada frontorinia, malformación congénita hereditaria de carácter recesivo derivada de un desarrollo facial anómalo (Twigg et al., 2009). Su cuadro clínico es variable, pero en la mayoría de los casos incluye hipertelorismo, puente nasal ancho, crestas nasales cortas y punta de la nariz bífida (Twigg et al., 2009). Por otro lado, en humanos se ha encontrado una asociación genética entre *ALX3* y la aparición de hendidura palatina (Jugessur et al., 2009). Además, en modelos murinos se ha demostrado que en los primeros estadios del desarrollo craneofacial *Alx3* participa en la formación de la mandíbula bajo el control de los factores de transcripción *Dlx5* y *Dlx6* (Jeong et al., 2008). La inactivación concomitante de *Alx3* y *Alx4* cursa con anomalías craneofaciales severas (Beverdam et al., 2001). Por otro lado, bajo la acción de los genes *Hox*, *Alx3* y *Alx4* también participan en la formación y cierre de la pared abdominal ventral (Manley et al., 2001).

La deficiencia de *Alx3* en ratones causa defectos en el cierre del tubo neural (Lakhwani et al., 2010) y polidactilia con una penetrancia del 12%. Por otro lado, la haploinsuficiencia de *Alx4* en ratones produce también polidactilia preaxial, anomalías leves del esqueleto craneofacial y gastrosquisis, defecto caracterizado por la herniación del intestino a través de la pared abdominal, mientras que la deficiencia total por inactivación de los dos alelos cursa con una reducción del tamaño de los huesos parietales, alopecia dorsal y alteraciones en los genitales (Qu et al., 1997b; Qu

et al., 1998), características fenotípicas similares a las de los pacientes que presentan una mutación en *ALX4* (Kayserili et al., 2009).

Curiosamente, *Alx3* fue identificado por primera vez como un fragmento expresado en la línea celular de insulinoma HIT-T15 en un estudio diseñado para detectar posibles factores de transcripción importantes para el desarrollo y/o la función de las células β pancreáticas (Rudnick et al., 1994). Posteriormente, se ha demostrado su expresión en células de los islotes pancreáticos en ratones adultos y su papel como regulador de la expresión de genes esenciales para la función pancreática, como los que codifican el glucagón, la glucoquinasa y la insulina (Mirasierra y Vallejo, 2006; Mirasierra et al., 2011). Además, la carencia de *Alx3* en ratones adultos produce una reducción de tamaño de los islotes pancreáticos, un descenso en el contenido de insulina y glucoquinasa y un incremento de la apoptosis alterando, de esta forma, el funcionamiento de las células del islote y comprometiendo su viabilidad. Todo esto termina conduciendo a un fallo en el control de la homeostasis de la glucosa que se manifiesta como una diabetes moderada y una resistencia a insulina en animales maduros (Mirasierra et al., 2011).

1.1.4. Regulación de *Alx3* por ácido fólico.

Los defectos del cierre del tubo neural representan un grupo relativamente frecuente de malformaciones congénitas. Hay diferentes tipos como son la anencefalia, la acrania, el encefalocele y la espina bífida. Para explicar las bases moleculares de los defectos del cierre del tubo neural se ha propuesto un modelo multifactorial según el cual factores ambientales (Finnell et al., 2002) y genéticos interaccionan de una forma compleja (Zohn y Sarkar, 2008; Harris y Juriloff, 2010). En humanos, se sabe desde hace años que el suplemento de la dieta con ácido fólico reduce su incidencia hasta un 70% (Czeizel y Dudas, 1992; Eichholzer et al., 2006). Sin embargo, el mecanismo por el cual el ácido fólico contribuye a esta reducción es desconocido (Blom et al., 2006).

En ratones se han identificado una serie de genes cuya inactivación cursa con defectos del cierre del tubo neural (Copp et al., 2003; Harris y Juriloff, 2010). En algunos casos como el de *Cart1* (Zhao et al., 1996), se observa que la administración de ácido fólico durante la gestación puede revertir estos defectos. Esto sugiere que el ácido fólico podría activar mecanismos compensatorios que conducen a la expresión

de genes que están implicados en el cierre del tubo neural.

Los factores de transcripción *Alx3* y *Cart1* están muy relacionados entre sí y además se expresan en las mismas regiones durante el desarrollo embrionario. En el ratón, la deficiencia de cada uno de ellos causa defectos del cierre del tubo neural, por lo tanto *Alx3* y *Cart1* están directamente implicados en los mecanismos que regulan el cierre del tubo neural. En trabajos anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio se demostró que el ácido fólico induce la expresión de *Alx3 in vitro* y su carencia durante el desarrollo temprano impide la expresión de *Alx3* conduciendo a un exceso de muerte celular en la región anterior de la cabeza y como consecuencia a defectos del cierre del tubo neural (Lakhwani et al., 2010). Sin embargo, la expresión de *Cart1* no está inducida por el ácido fólico (Lakhwani et al., 2010). Todo esto sugiere que para que el ácido fólico prevenga los defectos del cierre del tubo neural en los ratones carentes de *Cart1* es necesaria la inducción de la expresión *Alx3*.

A pesar del demostrado papel preventivo del ácido fólico, alrededor de un 30% de los defectos del cierre del tubo neural en humanos son resistentes a su suplementación (Czeizel y Dudas, 1992). Por lo tanto, es posible que un conjunto de defectos del cierre del tubo neural se deba a alteraciones en genes cuya expresión depende de la presencia de ácido fólico, explicándose así la incapacidad de esta vitamina para prevenir el cierre anormal de tubo neural. Esto explica el que los defectos del cierre del tubo neural que aparecen en los embriones *Alx3*^{-/-} sean resistentes al ácido fólico (Lakhwani et al., 2010).

Alx3 constituye la primera diana biológica no metabólica conocida del ácido fólico y permite relacionar el demostrado papel preventivo de esta vitamina en la incidencia de determinadas enfermedades congénitas del tubo neural con los mecanismos que regulan el cierre del mismo durante el desarrollo embrionario.

1.2. Diabetes y desarrollo embrionario.

1.2.1. Malformaciones congénitas asociadas a la diabetes durante el embarazo.

La diabetes constituye una enfermedad compleja que se desarrolla como consecuencia de la aparición de un grupo heterogéneo de trastornos metabólicos. En su generación interaccionan factores genéticos y ambientales que producen un desequilibrio entre los niveles de glucosa en sangre y la disponibilidad o acción de la insulina. Ello da lugar a la aparición de hiperglucemia crónica que daña diferentes tejidos y produce retinopatías, nefropatías, vasculopatías y neuropatías.

Aparte de estas patologías, está bien establecido que una de las complicaciones más severas de la diabetes durante el embarazo es la embriopatía diabética, en la cual, los embriones presentan un alto riesgo de desarrollar malformaciones congénitas o muerte (Pedersen y Molsted-Pedersen, 1979; Mills, 1982; Loffredo et al., 2001; Evers et al., 2004). La incidencia de estas malformaciones durante embarazos diabéticos es del 4 al 10% comparada con el 1% aproximadamente con el que aparecen en la población general (Suhonen et al., 2000). A pesar de las mejoras que se han producido en las últimas décadas en el control de la diabetes durante el embarazo, la incidencia de las malformaciones sigue siendo más común en embarazos de madres diabéticas que en el resto (Evers et al., 2004). Además este riesgo puede incrementarse con la obesidad materna (Werler et al., 1996; Moore et al., 2000).

Estas malformaciones pueden afectar a casi cualquier órgano como el cerebro, la medula espinal, el corazón, la mayoría de los grandes vasos, los riñones, el intestino y las estructuras esqueléticas (Miodovnik et al., 1988; Becerra et al., 1990; Schaefer-Graf et al., 2000; Nielsen et al., 2005; Macintosh et al., 2006). Sin embargo, los defectos cardiovasculares y los asociados al cierre del tubo neural, incluyendo la espina bífida y la anacefalia son los más comunes (Miodovnik et al., 1988; Becerra et al., 1990; Loffredo et al., 2001). Estas malformaciones se producen en los primeros estadios de la organogénesis antes de la séptima semana de la gestación humana (Mills et al., 1979; Martínez-Frias, 1994). Por otro lado, la diabetes materna puede afectar al cigoto antes de la implantación (Moley et al., 1998) y esto se manifiesta más tarde en el desarrollo de malformaciones como retraso en el crecimiento y reabsorciones espontáneas (Wyman et al., 2008).

Aunque durante un embarazo normal se produce una relativa intolerancia a la glucosa, solo en un 4% de las mujeres gestantes sin historia previa de padecer la enfermedad se desarrolla diabetes gestacional, la cual se define como un proceso de resistencia de insulina que aparece alrededor de la semana 28 de gestación. A diferencia de los embarazos en mujeres previamente diabéticas, no se producen malformaciones estructurales porque se desarrolla después del periodo de la organogénesis (Freinkel, 1980; Metzger et al., 2007). Sin embargo algunos estudios han observado un incremento de estos defectos congénitos, pero lo más probable es que se trate de mujeres con diabetes tipo II no diagnosticada antes del embarazo (Aberg et al., 2001; Farrell et al., 2002).

Las mujeres con diabetes tipo I o II, así como las que desarrollan diabetes gestacional pueden presentar durante la gestación una serie de problemas o riesgos. En concreto, las principales complicaciones obstétricas son la muerte fetal intrauterina y un excesivo crecimiento fetal como consecuencia de hiperinsulinismo que puede conducir a macrosomía (recién nacidos de tamaño grande) y por lo tanto a partos traumáticos. Además en estos neonatos pueden aparecen alteraciones metabólicas como hipocalcemia, policitemia, hiperbilirrubinemia, así como mortalidad en los recién nacidos por el síndrome de distrés respiratorio (Metzger et al., 2007).

En resumen, a pesar de que otros cambios metabólicos puedan estar implicados en la incidencia de malformaciones, la hiperglucemia es la principal responsable de los efectos severos de la diabetes materna durante la embriogénesis. Por lo tanto, comprender los mecanismos moleculares que están implicados en la embriopatía diabética podría conducir al desarrollo de nuevas estrategias para prevenir estos defectos.

1.2.2. Bases moleculares de la embriopatía diabética.

La patogénesis de las malformaciones congénitas observadas en la embriopatía diabética es compleja y hasta ahora poco conocida (Greene, 2001). Sin embargo, se sabe que la carga genética del embrión, así como el ambiente materno (hiperglucemia, hipercetonemia, metabolismo de prostaglandinas alterado), desempeñan un papel importante.

Se han detectado diferentes cambios bioquímicos que contribuyen a la alteración del desarrollo embrionario, como son un incremento de la actividad de la proteína quinasa C (Hiramatsu et al., 2002; Gareskog y Wentzel, 2004; Gareskog et al., 2007), un déficit de ácido araquidónico (Goldman et al., 1985; Engstrom et al., 1991), un defecto en la síntesis de prostaglandinas (Schoenfeld et al., 1995; Wentzel et al., 1999), y defectos en la señalización de los factores de transcripción PPAR α , γ y δ (Higa et al., 2007; Capobianco et al., 2008; Martínez et al., 2008). Sin embargo, ninguno de esos estudios determinó cómo estos cambios bioquímicos pueden conducir a una alteración en la morfogénesis.

Otro de los mecanismos propuestos para explicar la aparición de malformaciones es el incremento del estrés oxidativo en el embrión (Viana et al., 1996; Siman y Eriksson, 1997; Weksler-Zangen et al., 2003). Durante la diabetes materna, el metabolismo de la glucosa incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno, que incluyen radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), aniones superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Eriksson et al., 1991). En condiciones normales, las primeras etapas embrionarias se llevan a cabo en un ambiente relativamente hipóxico (la presión parcial de O_2 es de 20-25 mmHg) en comparación con el de la circulación arterial materna (99-106 mmHg) (Rodesch et al., 1992; Fischer y Bavister, 1993). Esta diferencia obedece a la falta de vascularización fetal y a que el oxígeno derivado de la circulación materna debe difundir a través de varias capas de tejido antes de llegar al embrión. Esta falta relativa de oxígeno explica por qué el metabolismo de la glucosa es esencialmente anaeróbico durante las primeras etapas de la embriogénesis.

El aumento del tamaño del embrión y de las membranas circundantes causa un estado fisiológico de hipoxia que lleva a la activación de genes que inducen la formación del sistema circulatorio fetal. Debido a esta relativamente baja disponibilidad de oxígeno, solo un 8% de la glucosa se metaboliza de forma oxidativa antes de que se desarrolle el sistema circulatorio (Akazawa et al., 1994) y por eso se producen muy pocas especies reactivas de oxígeno durante el desarrollo normal. Sin embargo, en un embarazo de madre diabética, el aporte incrementado de glucosa a los tejidos embrionarios antes de la formación del sistema circulatorio hace que para ser eliminada aumente su metabolismo oxidativo con un consumo más rápido de oxígeno. La acentuada hipoxia generada excede los límites fisiológicos que caracterizan al desarrollo normal, por lo que se estimula la producción mitocondrial de especies

reactivas de oxígeno que desencadenan estrés oxidativo (Yang et al., 1995; Yang et al., 1998; Akazawa, 2005) (Figura 2). Este estrés oxidativo puede incrementar la peroxidación lipídica (Wentzel et al., 1999; Akazawa, 2005), producir daño en el DNA y en el RNA, inducir la oxidación de proteínas y producir la inactivación de enzimas. Todo ello puede desencadenar un daño celular masivo que se manifiesta como un aumento de la apoptosis en el embrión que tiene como consecuencia un desarrollo embrionario defectuoso (Eriksson y Borg, 1993; Fine et al., 1999; Zangen et al., 2002; Eriksson et al., 2003).

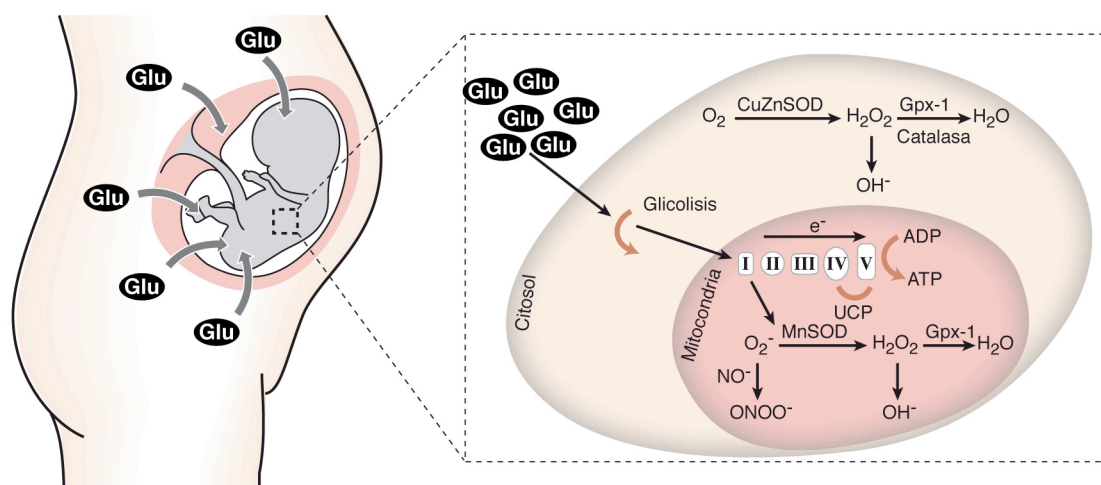


Figura 2. Estrés oxidativo en el tejido embrionario a causa de la hiperglucemia materna. Durante la hiperglucemia, el aporte incrementado de glucosa a los tejidos embrionarios hace que aumente su metabolismo oxidativo con un consumo más rápido de oxígeno. En estas condiciones se estimula la producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno (O_2^- , H_2O_2 , OH^- y $ONOO^-$) por acción de los complejos I y II de la cadena respiratoria llevando a un estado de estrés oxidativo si estos radicales libres no son destruidos por los mecanismos embrionarios de defensa antioxidante.

1.3. Factores de transcripción bHLH.

1.3.1. Características generales y clasificación.

Los proteínas bHLH constituyen una clase de factores de transcripción ampliamente distribuidos en los organismos eucariotas y desempeñan importantes funciones en muchos procesos esenciales del desarrollo, regulando el crecimiento celular y la diferenciación (Massari y Murre, 2000; Jones, 2004). Los miembros de esta superfamilia se caracterizan por la presencia de un dominio hélice-lazo-hélice (HLH), constituido por dos hélices α antipáticas denominadas H1 y H2, separadas por una región flexible, no helicoidal (lazo) de longitud variable e importante para el mantenimiento de la estructura terciaria del motivo HLH. A través de este dominio, las

proteínas HLH forman homo o heterodímeros, lo cual es esencial para su función reguladora de la transcripción (Murre et al., 1989). En el proceso de dimerización, las hélices H2 interaccionan entre sí formando un núcleo hidrofóbico (Shirakata et al., 1993; Goldfarb et al., 1998).

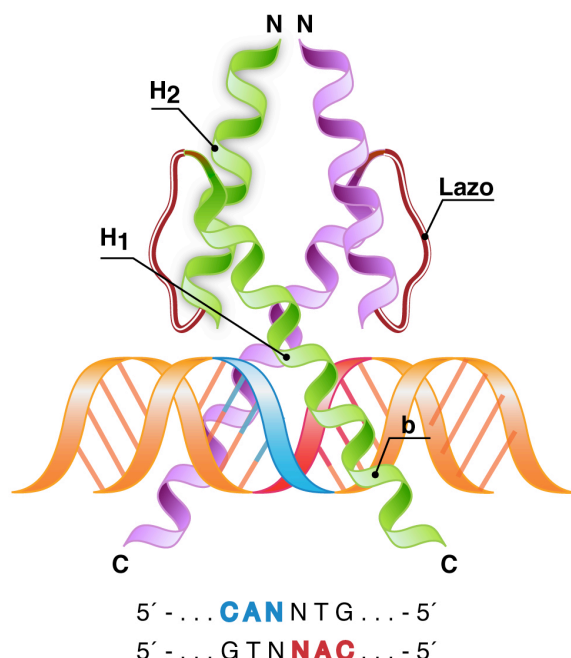









Figura 3: Representación de un dímero de proteína bHLH unido al DNA. Las cuatro hélices α (dos por cada factor) se disponen de forma paralela, de modo que los residuos se agrupan formando un núcleo hidrofóbico. La hélice H2 media la interacción proteína-proteína, mientras que la otra (H1) toma contacto con el surco mayor del DNA a través de la región básica (b). Adaptado de Ferre-D'Amare et al (1993) ;Longo et al (2008).

Adicionalmente, la mayor parte de esas proteínas tienen una región básica adyacente al motivo HLH en el extremo N-terminal de la hélice H1, que media su unión al DNA, y de ahí su denominación como bHLH (Davis et al., 1990; Voronova y Baltimore, 1990). Los sitios consenso de unión más frecuentes de estas proteínas son las cajas E (CANNTG), presentes en los promotores de numerosos genes. Estudios cristalográficos han determinado que cada monómero bHLH interacciona con una mitad de la caja E, mediante el contacto del dominio básico con la hendidura mayor del DNA (Figura 3) pudiendo estar también implicados residuos adicionales situados en el lazo y en la segunda hélice del dominio HLH (Ellenberger et al., 1994; Longo et al., 2008).

Las proteínas HLH se han clasificado en siete clases (I-VII), según su distribución en los tejidos, su capacidad para formar dímeros y su especificidad en la unión al DNA (Massari y Murre, 2000; Jones, 2004) (Tabla 1). Las más abundantes son las pertenecientes a las clases I, II y V. Por su relación con el estudio llevado a cabo en la presente tesis, describiremos sólo tres de estas clases.

Tabla 1: Clasificación de las proteínas HLH.

Clase	Características	Ejemplos	Funciones
I 	Expresión amplia, aunque no ubicua; capaces de homodimerizar o heterodimerizar	HEB α , HEB β , E12, E47, E2-2A, E2-2B	Linfogénesis, miogénesis, neurogénesis, etc.
II 	Patrón de expresión específico de tejido; suelen heterodimerizar con las proteínas bHLH de clase I	MyoD, Mash1, Twist1/2, NeuroD, Tal1	Miogénesis, neurogénesis, desarrollo del páncreas, hematopoyesis, etc
III 	Presentan una cremallera de leucina (LZ) adyacente al motivo bHLH	Myc, MTF, USF1/2	Proliferación, diferenciación, apoptosis, función pancreática, etc.
IV 	Capaces de heterodimerizar con Myc o entre ellas	Max, Mad	Proliferación, apoptosis etc.
V 	Carecen de dominio de unión al DNA; actúan como dominantes negativos de las proteínas de la clase I y II	Id1, Id2, Id3 e Id4	Proliferación, diferenciación, angiogénesis, etc.
VI 	Contienen Prolina en la región básica	HES, HERS1	Ruta de señalización Notch, proliferación, etc
VII 	Contienen un dominio bHLH-PAS	AHR, RNAt, HIF1 α	Respuesta a hidrocarburos aromáticos, respuesta a hipoxia, etc

H1-L-H2: dominio HLH (H1: hélice 1, L: lazo, H2: hélice 2); b: región básica, adyacente al dominio HLH; LZ: cremallera de leucinas (*leucine zipper*); PAS: dominio PAS; Pro: prolina. Adaptado de Massari y Murre (2000).

La clase I está constituida por las proteínas E (Massari y Murre, 2000), que se expresan en muchos tejidos aunque no son ubicuas. Generalmente se unen al DNA

formando heterodímeros con factores bHLH de la clase II, aunque también son capaces de formar homo o heterodímeros entre sí (Massari y Murre, 2000). Los factores de esta clase actúan normalmente como activadores transcripcionales, pero también pueden actuar como represores, dependiendo de la proteína bHLH con la que dimericen y/o de su interacción con co-represores o co-activadores (Perez-Moreno et al., 2001; Murayama et al., 2004; Goardon et al., 2006).

La Clase II está constituida por factores con expresión específica de tejidos, como los factores miogénicos MyoD y miogenina (Weintraub et al., 1991; Hasty et al., 1993); el factor neuronal Mash1 (Guillemot et al., 1993); NeuroD, involucrado en desarrollo neural y pancreático (Wilson et al., 2003); y Twist, implicado en el desarrollo del mesodermo (Barnes y Firulli, 2009). Salvo excepciones, son incapaces de formar homodímeros y heterodimerizan preferiblemente con las proteínas de la clase I (Massari y Murre, 2000). Por su parte, las proteínas de la clase III que incluyen a factores transcripción como Myc, MTF, USF1 y USF2, se caracterizan por tener un motivo cremallera de leucinas (LZ, del inglés Leucine-Zipper) adyacente al motivo bHLH (Hodgkinson et al., 1993; Bendall y Molloy, 1994; Luo y Sawadogo, 1996).

Por su relación con el trabajo desarrollado en la presente tesis, centraremos nuestra atención en los factores Twist, USF1 y USF2.

1.3.2. Twist.

1.3.2.1. Características generales.

El factor de transcripción Twist pertenece a la clase II de las proteínas bHLH (Massari y Murre, 2000). Se identificó por primera vez en *Drosophila* (D-Twist) como un factor crucial para la gastrulación y el desarrollo del mesodermo (Simpson, 1983; Thisse et al., 1988). Se trata de una proteína con una secuencia muy conservada a lo largo de la evolución que participa en procesos del desarrollo embrionario desde insectos hasta mamíferos (Castanon y Baylies, 2002). En vertebrados existen dos genes, *Twist1* (*Twist*) y *Twist2* (conocido también como *Dermo-1*), que codifican proteínas cuyas secuencias presentan más del 90% de similitud en el extremo carboxilo-terminal, que incluye el dominio bHLH (Wolf et al., 1991; Li et al., 1995; Bialek et al., 2004). *Twist1* presenta una región rica en residuos de glicina de la que carece *Twist2* (Li et al., 1995). Aunque los patrones de expresión de *Twist2* durante la

embriogénesis del ratón se solapan con los de *Twist1*, la expresión *Twist2* sigue temporalmente a la aparición de *Twist1* (Wolf et al., 1991; Li et al., 1995; Lee et al., 2000).

Las proteínas Twist tienen la capacidad de formar tanto homodímeros como heterodímeros con otras proteínas bHLH. La selección de pareja para formar dímeros esta modulada en parte por la fosforilación de residuos de serina y treonina localizados en la primera hélice α , en el sitio opuesto al dominio básico de unión al DNA (Firulli et al., 2003; Firulli et al., 2005; Firulli y Conway, 2008) (Figura 4).

Según con qué otro factor forme dímeros, Twist desempeña diferentes funciones biológicas durante el desarrollo (Castanon y Baylies, 2002), pudiendo actuar como activador o como represor de la transcripción. Entre las posibles parejas de Twist se incluyen las proteínas E, con las que interacciona directamente a través de sus dominios bHLH para unirse eficientemente a las cajas E (Spicer et al., 1996; Hamamori et al., 1997; Verzi et al., 2002).

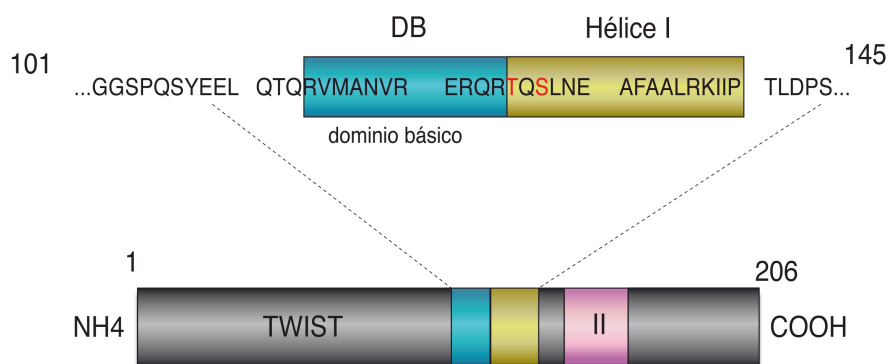


Figura 4: Esquema de Twist1 de ratón. Se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al DNA (DB) y de la hélice I. Los residuos de treonina y serina se indican en rojo. Adaptado de Firulli et al. (2007).

1.3.2.2. Patrón de expresión y funciones durante el desarrollo.

Twist se expresa en las células del mesodermo durante el desarrollo embrionario tanto en vertebrados como en invertebrados (Thisse et al., 1988; Wolf et al., 1991; Fuchtbauer, 1995). En el ratón desempeña un papel crítico en la regulación del desarrollo craneofacial y de las extremidades (O'Rourke et al., 2002), así como en el cierre del tubo neural (Chen y Behringer, 1995). A partir de E7.5, se expresa en el

mesénquima craneal, en los somitos y en la placa lateral del mesodermo (Fuchtbauer, 1995). En E8.5 *Twist* aparece también en el primer arco branquial (Chen y Behringer, 1995; Gitelman, 1997). Posteriormente, en E9.5 se expresa en el mesodermo del primordio de las extremidades, en el primordio craneofacial, en los arcos branquiales, en la cresta neural torácica y cefálica y en el mesodermo paraxial (Wolf et al., 1991; Fuchtbauer, 1995; Stoetzel et al., 1995; Gitelman, 1997). Más adelante (E16-E18) la expresión de *Twist* se detecta en los osteoblastos en desarrollo, en el mesénquima craneal y en el mesénquima del primordio de los dientes (Fuchtbauer, 1995; Bialek et al., 2004).

Muchas de las funciones de *Twist* durante el desarrollo embrionario se han esclarecido gracias a estudios realizados con ratones modificados genéticamente. Los ratones en los que se han inactivado los dos alelos de este gen presentan defectos en el cierre del tubo neural, somitos con una elevada apoptosis y escasa compartimentalización, hipoplasia de los arcos branquiales y letalidad embrionaria alrededor de E11.5 (Chen y Behringer, 1995; O'Rourke et al., 2002; Soo et al., 2002; Zuniga et al., 2002).

En humanos, la haploinsuficiencia de *TWIST1* debida a la pérdida de función de un alelo causa un cuadro patológico de transmisión autosómica dominante conocido como síndrome de Saethre-Chotzen. Este síndrome se caracteriza por la asociación de una fusión prematura de las suturas del cráneo (cranioestenosis) con anomalías de los miembros. Las características clínicas más comunes consisten en sinostosis coronal, braquicefalia, línea de cabello frontal baja, asimetría facial, hipertelorismo, desviación del tabique nasal, defectos en las extremidades con alteraciones digitales como la polidactilia y ocasionalmente hendidura palatina (Howard et al., 1997; Johnson et al., 1998; Lee et al., 2002).

Los ratones heterocigotos son viables, exhiben polidactilia preaxial con penetrancia parcial, y alteraciones en la fusión de la sutura coronal y en otras suturas craneales (el Ghouzzi et al., 1997; Bourgeois et al., 1998; Carver et al., 2002). Por tanto, constituyen un buen modelo del síndrome de Saethre-Chotzen.

1.3.2.3. Twist como posible regulador de la expresión de *Alx3*.

Existen evidencias que indican que algunos de los genes de la familia *aristaless* (*Alx3*, *Alx4* y *Cart1*) pueden estar regulados directamente por *Twist*. Estos genes se expresan en varios tejidos embrionarios en los cuales también se expresa *Twist* (Zhao et al., 1996; Qu et al., 1997a; ten Berge et al., 1998; Beverdam y Meijlink, 2001; Loebel et al., 2002), y sus promotores contienen cajas E situadas en regiones conservadas que constituyen sitios potenciales de unión de *Twist* (Loebel et al., 2002).

En el ratón, se ha demostrado que la expresión de *Alx3*, *Cart1* y *Alx4* está disminuida en los primordios de las extremidades y en el mesénquima de la región anterior de la cabeza de embriones carentes de *Twist* (Loebel et al., 2002; Soo et al., 2002; Bildsoe et al., 2009).

Los fenotipos de los ratones con mutaciones en los genes de la familia *aristaless* comparten características con el fenotipo de los que tienen inactivado *Twist*, lo cual sugiere que estos genes están relacionados funcionalmente. En el caso de *Alx4*, se ha determinado que su expresión es necesaria para el desarrollo normal de las extremidades ya que su carencia desencadena la aparición de polidactilia (Qu et al., 1997b; Qu et al., 1998; Takahashi et al., 1998) al igual que ocurre en los ratones *Twist*^{+/−}. Por su parte, los ratones *Alx3*^{+/−} también presentan polidactilia con una penetrancia del 12%. Las malformaciones de las extremidades son más severas cuando están simultáneamente inactivados *Alx4* y *Cart1*. Durante el desarrollo embrionario, el ratón *Cart1*^{+/−} y el doble mutante de *Alx3*^{+/−}/*Alx4*^{+/−} presentan severos defectos a nivel craneofacial (Qu et al., 1999; Beverdam et al., 2001), similares a los de los ratones carentes de *Twist*. Asimismo, una proporción de los embriones *Alx3*^{+/−} presentan el tubo neural craneal anormalmente abierto (Lakhwani et al., 2010).

Todo esto sugiere que *Twist* podría mediar directamente en la regulación de los genes de la familia *aristaless* en las extremidades y en el desarrollo craneofacial (Loebel et al., 2002).

1.3.3. USF.

1.3.3.1. Identificación y características.

Los factores de transcripción USF (**Upstream Stimulatory Factor**) pertenecen a la clase III de factores de transcripción bHLH, caracterizada por la presencia de un dominio de cremallera de Leucinas (bHLH-LZ) (Atchley y Fitch, 1997) (Figura 5A). En estos factores de transcripción, la integridad del motivo LZ es muy importante para la unión de su región básica a las cajas E del DNA (Baxevanis y Vinson, 1993; Sha et al., 1995). Por otro lado, los USF pueden unirse también a los elementos iniciadores ricos en pirimidinas (inr) adyacentes al sitio de inicio de la transcripción en promotores carentes de caja TATA (Corre y Galibert, 2005).

Se identificaron por primera vez en células humanas por su importancia en la regulación de la transcripción del promotor tardío principal del adenovirus (Carthew et al., 1985; Sawadogo y Roeder, 1985; Moncollin et al., 1986). La purificación de los USF humanos a partir de extractos nucleares de células Hela mostró la existencia de dos polipéptidos diferentes de 43 y 44 kDa (Sawadogo, 1988; Sawadogo et al., 1988). El análisis de la secuencia de estas proteínas permitió identificar dos genes distintos denominados *USF1* y *USF2* (Gregor et al., 1990; Sirito et al., 1992; Sirito et al., 1994).

Las secuencias de las regiones bHLH-LZ de *USF1* y *USF2* exhiben una similitud del 70%, mientras que las proteínas completas solo son similares en un 44% (Sirito et al., 1994). *USF1* y *USF2* divergen en sus secuencias del extremo N-terminal, pero presentan en el extremo C-terminal un dominio bHLH-LZ muy conservado en diferentes especies que es importante para la dimerización y unión al DNA (Sirito et al., 1992). Cerca del extremo N-terminal de la región básica existe una región denominada USR (USF-specific region) (Figura 5B) que es esencial para la activación de la transcripción (Groenen et al., 1996; Luo y Sawadogo, 1996; Qyang et al., 1999).

La dimerización de *USF1* y *USF2* está determinada por la interacción de las hélices anfipáticas de los motivos HLH y LZ, por lo que sólo pueden interaccionar con miembros de las familias bHLH o bHLH-LZ (Baxevanis y Vinson, 1993; Ciarapica et al., 2003) o formar homodímeros (Sirito et al., 1994). Según con qué otras proteínas formen dímeros, los USF pueden actuar como activadores o como represores de la transcripción. En el caso de los homo o heterodímeros de *USF1* y *USF2*, activan la expresión de diferentes tipos de genes cooperando específicamente con otros factores

a través de su extremo N-terminal (Jaiswal y Narayan, 2001; Takahashi et al., 2001; Gao et al., 2003; Ge et al., 2003; Kumari et al., 2005).

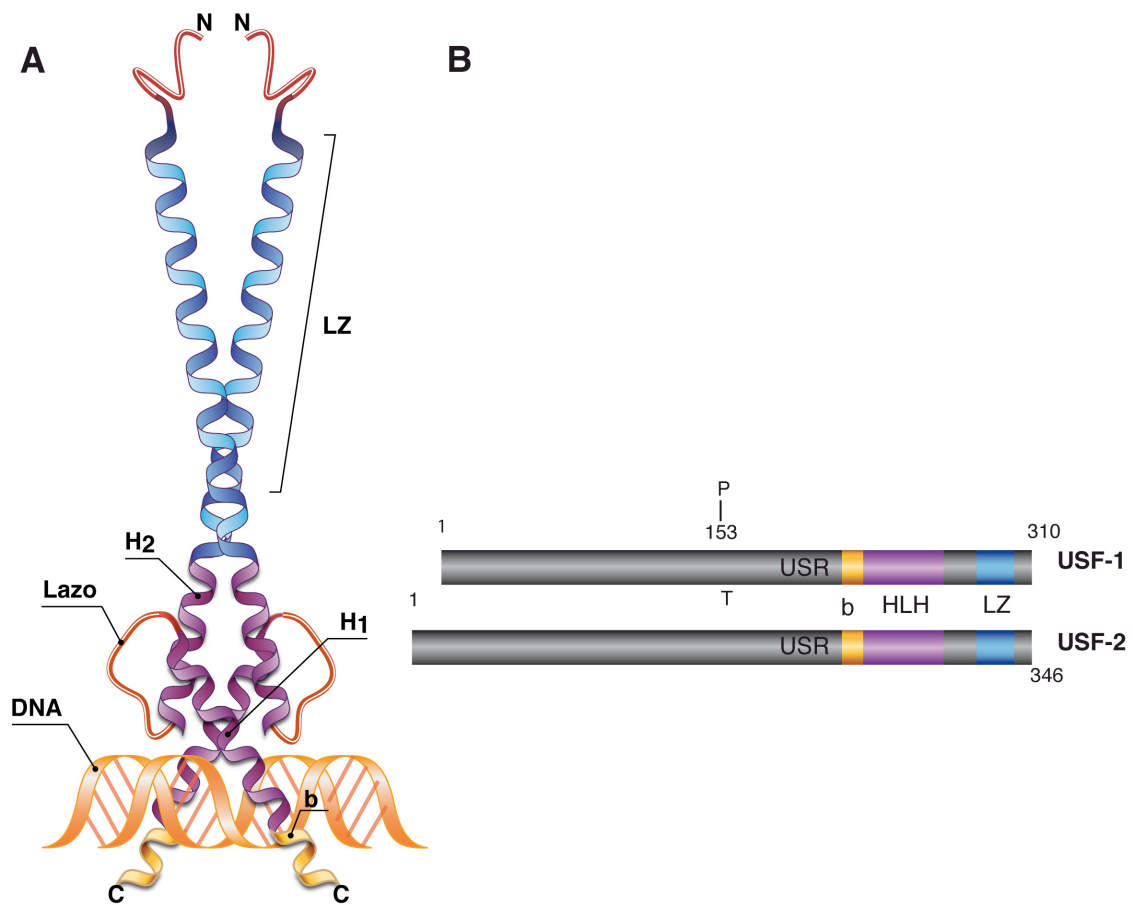


Figura 5: Representación de los factores de transcripción USF. A, Representación de un dímero de USF unido al DNA. B, Las secuencias en colores corresponden al dominio básico (amarillo), al motivo HLH (morado) y LZ (azul). El dominio USR, está localizado delante de la región básica y es esencial para la activación de la transcripción. La fosforilación en T153 de USF1 es necesaria para la actividad transcripcional.

La expresión dependiente de USF también puede regularse de forma negativa a través de variantes de *splicing* (Gregor et al., 1990; Saito et al., 2003). En el caso de USF2, una isoforma denominada USF2b forma heterodímeros con las proteínas USF e inhibe la activación transcripcional de los promotores correspondientes (Viollet et al., 1996; Howcroft et al., 1999). Esta isoforma carece de la región codificada por el exón 4 que contiene un dominio de regulación positiva, mientras que USR y los dominios de regulación negativa permanecen intactos.

1.3.3.2. Patrón de expresión y funciones.

Está bien establecido que estos factores de transcripción se expresan de manera ubicua (Gregor et al., 1990; Sirito et al., 1994; Corre y Galibert, 2005), aunque sus niveles de expresión y su estado de dimerización puede variar en diferentes tipos celulares (Viollet et al., 1996; Sirito et al., 1998).

Los USF están implicados en muchas funciones esenciales a través de su participación en los mecanismos moleculares que controlan importantes procesos celulares (ciclo celular, proliferación celular, transformación celular) (Cogswell et al., 1995; Luo y Sawadogo, 1996; Pawar et al., 2004), del desarrollo o de respuesta a estrés (Corre y Galibert, 2005).

Una primera aproximación a la dilucidación de las funciones de USF1 y USF2 se obtuvo en ratones en los que se inactivaron estos genes mediante recombinación homóloga. De esta forma, se comprobó que los ratones carentes de *USF2* presentan un retraso en el crecimiento con alteraciones en los rasgos que marcan las proporciones del cuerpo (Sirito et al., 1998). Por otro lado, los ratones deficientes en *USF1* presentan anomalías morfológicas, y ocasionalmente tienen episodios epilépticos o alteraciones conductuales (Sirito et al., 1998). El que estos dos ratones muestren un fenotipo distinto pone de manifiesto que los USF ejercen diferentes funciones celulares que no son redundantes (Sirito et al., 1998; Casado et al., 1999). No obstante, el doble mutante *USF1*^{-/-}/*USF2*^{-/-} presenta letalidad embrionaria, lo cual sugiere que una mínima actividad de USF es necesaria y esencial para embriogénesis (Corre y Galibert, 2005). Los ratones transgénicos para el gen *USF2*, presentan una marcada albuminuria, lo cual es indicativo de fallo renal (Liu et al., 2007).

Como ya hemos mencionado, los factores USF participan en la regulación de la expresión de múltiples genes a través de interacciones específicas con otros factores (Kirschbaum et al., 1992; Luo y Sawadogo, 1996). Entre ellos, se encuentran factores de transcripción, enzimas remodeladoras de cromatina y factores del complejo de preiniciación de la transcripción, entre otros (Han et al., 2001; West et al., 2004; Corre y Galibert, 2005).

Además, se sabe que participan en el control del metabolismo de los glúcidos, ya que regulan la expresión de genes como insulina, glucoquinasa y el receptor de glucagón entre otros (Read et al., 1993; Portoís et al., 2002; Roth et al., 2004). Están

también implicados en el control del metabolismo de los lípidos y en la lipogénesis (Pajukanta et al., 2004; Corre y Galibert, 2005; Laurila et al., 2010; Wu et al., 2010). Estudios adicionales sugieren que esta implicación de los USF en el metabolismo de los lípidos y glúcidos podría estar conectada a enfermedades como la diabetes tipo II (Putt et al., 2004). En relación con esto, se sabe que controlan la expresión en respuesta a glucosa de genes importantes para la nefropatía diabética (Zhu et al., 2005; Sanchez y Sharma, 2009).

Objetivos



OBJETIVOS

La hipótesis planteada en la presente tesis doctoral es que la expresión de *Alx3* depende de la presencia de niveles adecuados de ácido fólico y es importante para el correcto desarrollo embrionario durante la gestación transcurrida en condiciones de normo o hiperglucemia.

Para evaluar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Determinar la importancia de la expresión de *Alx3* en el mantenimiento de la supervivencia celular del mesénquima craneofacial durante el proceso del cierre del tubo neural.
2. Determinar si la prevención de las malformaciones congénitas por ácido fólico durante el desarrollo embrionario está condicionada por la expresión del *Alx3* *in vivo*.
3. Determinar los mecanismos transcripcionales que regulan la expresión de *Alx3*.
4. Determinar si *Alx3* constituye un factor protector contra las malformaciones congénitas inducidas por hiperglucemia gestacional.
5. Determinar el requerimiento de *Alx3* en la regulación de los niveles de expresión de genes inducidos por hiperglucemia en embriones de gestantes diabéticas.

Material y Métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Cultivos celulares.

Se han utilizado las siguientes líneas celulares:

3.1.1. RC2.E10.

Las células RC2.E10 constituyen una línea monoclonal establecida a partir de cultivos primarios de corteza cerebral de ratas Sprague-Dawley de 16 días de gestación (Schwartz y Vallejo, 1998). Se cultivaron en medio RPMI 1640 carente de ácido fólico (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (10%). El contenido de ácido fólico del suero se eliminó mediante tratamiento con la resina de intercambio iónico AG1-X8 (Bio-Rad) y con carbono activo, preparado en el servicio de Medios de Cultivo y Esterilización de nuestro instituto. Para prevenir los defectos metabólicos de la deficiencia de ácido fólico, al medio de cultivo se le añadió glicina (200 μ M), adenosina (100 μ M) y timina (10 μ M) (Sigma) (Zhao et al., 1998). Igualmente, se añadieron penicilina/estreptomicina (1%) y fungizona (1%). Las células se incubaron a 33 °C en presencia de CO₂ al 5 %.

3.1.2. Hela, NIH3T3 y Min6.

La línea celular Hela está constituida por células derivadas de un tumor uterino humano, mientras que la NIH3T3 esta formada por fibroblastos de ratón Swiss NIH inmortalizados. Ambas se cultivaron a 37 °C en un atmósfera de CO₂ al 5% utilizando medio DMEM (Gibco) suplementado con suero fetal bovino al 10%, fungizona (1%) y penicilina/estreptomicina (1%) (Gibco). La línea celular Min6 deriva de un insulinoma de ratón y se cultivó en las mismas condiciones salvo que el medio se suplementó con suero fetal bovino al 15% y β -mercaptoetanol (70 μ M).

3.2. Plásmidos.

3.2.1. Construcciones con fragmentos de la región 5' de *Alx3*.

Se construyeron plásmidos que contienen regiones del promotor de *Alx3* usando fragmentos generados a partir de DNA genómico de ratón mediante PCR. Los

oligonucleótidos utilizados fueron diseñados a partir de la secuencia disponible en la base de datos *Ensembl* (http://www.ensembl.org/Mus_musculus), y se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Oligonucleótidos diseñados para el clonaje del promotor de <i>Alx3</i> (5'-3')	
AlxX2780S	CACTCGAGCTAGAAGATGCAAGTCCACT
AlxX1997S	CACTCGAGCTAGAAGATGCAAGTCCACT
AlxX1506S	CACTCGAGGATTAGATGCCCTGAAATGA
Alx1079S	GTGTTACACACCAGGCCTCTTAGATTCT
AlxX750S	CACTCGAGGCAGTGGATCTGAGTGACAT
AlxXb490S	CATCTAGATTCCACAGCATCGAGTCTCT
AlxX202S	CACTCGAGGAGCCAAGGACTCACCCGAC
Alx967AS	TTATATTTTATAGGACCCCTGGAGATTAG
Alx119AS	AAGCAGTTGGAAGAGAAGAGAGGGAAGC
AlxHAS1	CAAAGCTTTGTGAGCCAAGGGGGAGGGA
AlxKUPR1S	CAGGTACCAGCTTGATTGTTAGAACCTCGTCA
AlxXUPR1AS	CACTCGAGATCTGTGGGTATCCAAGAGGAG
AlxKUPR2S	CAGGTACCGTACCCCGTGCCCTCTCAGTC
AlxXUPR2AS	CACTCGAGGTGAGGACGGAGGGCCAGCAGT
AlxKUPR3S	CAGGTACCGTGACACTCCCCACTTTGAATTGC
AlxXUPR3AS	CACTCGAGTCTGCATCTGCTTTGAAGCCCC
AlxKUPR4S	CAGGTACCCATAGAAAAACACTGTCTAGGT
AlxXUPR4AS	CACTCGAGCGAGGGGACTTTGGCCAACAGT
AlxKUPR5S	CAGGTACCGAGGCTCAAGGTTGGGGCGCAG
AlxSUPR5AS	CAGAGCTCGAGTCTTGTTGGGCTCACTAAC
AlxKUPR6S	CAGGTACCGGTGCGTTAGCGACCCTTCTCC
AlxXUPR6AS	CACTCGAGTATTTTAGGAATAAACAGAGAG
AlxKUPR7S	CAGGTACCGCCCGTTCATGTGCCCCAGGAGTGA
AlxXUPR7AS	CACTCGAGTCAGGAGACTTGAGGAGACAAAAGG
AlxKUPR8S	CAGGTACCGATGAACAGAAATCCAAAGGAC
AlxXUPR8AS	CACTCGAGCCAAGCAGGGTCTCCTCCAAGG'
AlxSalIntrónS	CAGTCGACCTGACCCACGAGTGGCTCAGCACCC'
AlxSalIntrónAS	CAGTCGACCGGCGGGGACACTGGACTGTGGTGG

Se construyeron dos series diferentes de plásmidos. Para la primera serie, se generaron delecciones secuenciales del extremo 5' del promotor. El fragmento más largo de esta primera serie abarca desde el nucleótido -2780 al nucleótido +88 (Figura 12), y el más corto abarca desde el -202 al +88, que corresponden a los plásmidos *Alx2780Luc* y *Alx202Luc*, respectivamente. Los fragmentos generados tras la amplificación fueron subclonados entre los sitios de restricción *XhoI* y *HindIII* del plásmido pGL3-Basic (Promega) que contiene el gen de la luciferasa que se utilizó como testigo.

Para construir la segunda serie de plásmidos, se generaron fragmentos correspondientes a determinadas regiones localizadas dentro de un segmento de 18 kb por encima del sitio de inicio de la transcripción, que fueron clonados en el

extremo 5' del promotor de *Alx3* en el plásmido Alx202Luc. Estos fragmentos se amplificaron mediante PCR a partir de un cromosoma artificial bacteriano (BAC mouse RP23, clone 4006; Invitrogen) y corresponden a regiones con un alto grado de conservación de su secuencia en mamíferos, que denominamos UPR1 a UPR8 (Upstream Promotor Regions) identificadas usando la base de datos *UCSC Genome Bioinformatics database* (<http://genome.ucsc.edu>) (Figura 6).

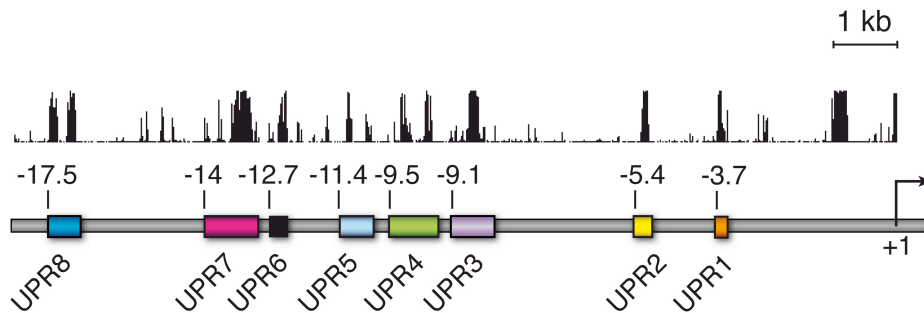


Figura 6: Representación esquemática de los diferentes fragmentos correspondientes a las regiones conservadas (UPR) del gen *Alx3*.

Por último, se amplificó otra región que se localiza en el extremo 5' del primer intrón de *Alx3*, cuya secuencia también presenta un alto grado de conservación entre especies y contiene una isla GpC. Este fragmento se introdujo en ambos sentidos en el sitio de restricción *Sall* situado en posición 3' con respecto al gen de luciferasa en los plásmidos Alx202Luc y Alx1506Luc (Figura 13).

3.2.2. Vectores de expresión en células eucariotas.

pcDNA3-Twist: Contiene del cDNA completo de *Twist* de ratón clonado en el plásmido de expresión pcDNA3. Fue proporcionado por la Dra. Amparo Cano (Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols).

pcDNA3-E47: Contiene el cDNA completo de *E47* clonado en el plásmido de expresión pcDNA3. Fue proporcionado por la Dra. Amparo Cano (Perez-Moreno et al., 2001)

Los vectores de expresión de los factores de transcripción *USF* corresponden a los descritos por (Coulson et al., 2003) y son los siguientes:

PN3 (USF1): Contiene el cDNA completo de *USF1* humano (43 kDa).

PN4 (USF2): Contiene el cDNA completo de *USF2* de ratón (44 kDa).

PUSF1 (DN-USF): Expresa un inhibidor dominante negativo de USF1 y USF2 .

3.3. Mutagénesis dirigida.

Las mutaciones de las dos cajas E presentes en el plásmido Alx202Luc fueron realizadas con el sistema *QuikChange II Site-Direct Mutagenesis Kit* (Stratagene) y comprobadas mediante secuenciación del DNA. Los plásmidos generados se denominaron Alx202Eb1mLuc y Alx202Eb2mLuc. A continuación se relacionan los oligonucleótidos empleados para la obtención de los mutantes (las mutaciones incorporadas aparecen marcadas con negrita y subrayadas):

Ebox1-37mut: 5'-GATCCGGGCCGCGC**CGCG**GACGTGGA-3'

Ebox2-121mut: 5'-GATCCCTCTTCC**CGCG**GCTTGTGA-3'

3.4. Transfecciones transitorias y ensayo de actividad luciferasa.

Se utilizaron células RC2.E10 y Hela sembradas a una densidad de 6×10^4 y 9×10^4 células por pocillo, respectivamente, en placas de 24 pocillos. Tras una incubación de 16 horas, las células se transfectaron con una mezcla de lipofectamina (25 μ l) (Invitrogen), los plásmidos con los diferentes fragmentos del promotor de *Alx3* (0.5 μ g), pRL-TK-renilla (0.05 μ g) y los plásmidos de expresión correspondientes (0.25 μ g), en 0.5 ml de medio RPMI sin ácido fólico libre de suero. Tras 4 horas de incubación se retiró la mezcla y se añadieron 0.5 ml de medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (10%) y a continuación se procedió a añadir a cada grupo experimental el correspondiente tratamiento con ácido fólico (10 μ M).

La actividad luciferasa se determinó 48 horas después de la transfección, utilizando para ello el *kit Dual Luciferase Assay* (Promega). Los valores obtenidos se normalizaron frente a los correspondientes a la actividad renilla y se expresan como porcentaje de la actividad de RSV-Luc generada en una placa de células independiente. Los valores indicados representan la media aritmética \pm error típico de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

3.5. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética en gel (EMSA).

Los EMSA se llevaron a cabo con extractos nucleares de células RC2.E10, Min6 y NIH3T3 (Schreiber et al., 1989) en presencia de los inhibidores de proteasas pepstatina A (1 mg/ml), leupeptina (10 mg/ml), aprotinina (10 mg/ml) y p-aminobenzamidina (0.1 mM). La concentración de proteína fue determinada mediante ensayo Bradford (Bio-Rad protein assay).

Para generar las sondas se utilizaron oligonucleótidos sintéticos de doble cadena con extremos cohesivos 5'-GATC. El marcaje radioactivo se llevó a cabo mediante una reacción de incorporación de [α -³²P]dATP catalizada por la polimerasa Klenow. Sus secuencias son las siguientes:

Ebox1	5'-GATCCGGGCGCGCACGTGACGTGGA-3'
Ebox2	5'-GATCCCTCTTCCAAGTCTTGTGA-3'
M-Ebox1	5'-GATCCGGGCGCGCGCGGACGTGGA-3'
M-Ebox2	5'-GATCCCTCTTCCCGCGGCTTGTGA-3'

Una vez marcados, los oligonucleótidos (10.000-20.000 cpm) se incubaron en hielo durante 20 minutos en presencia de 2 µg de ácido poli-(dI-dC) con los extractos nucleares (15-20 µg de proteína) en 20 µl de una solución compuesta por HEPES (20 mM, pH7.9), MgCl₂ (2.5 mM), KCl (70 mM), DTT (1 mM), EDTA (0.3 mM) y glicerol al 10%.

En caso necesario se añadieron a la mezcla de reacción antisueros específicos o IgG inespecíficas y se incubaron en hielo durante 15 minutos antes de añadir la sonda radiomarcada. Los antisueros específicos utilizados fueron los siguientes:

Anti-USF1 humano, generado en conejo y dirigido contra el extremo carboxilo-terminal (sc-229, Santa Cruz Biotechnology).

Anti-USF2 de ratón, generado en conejo y dirigido contra el extremo carboxilo-terminal (sc-862, Santa Cruz Biotechnology).

Anti-Twist humano, generado en cabra y dirigido contra el extremo amino-terminal (sc-6070, Santa Cruz Biotechnology).

Anti-E47 humano generado en conejo y dirigido contra la proteína completa (sc-763, Santa Cruz Biotechnology).

En caso necesario se añadieron oligonucleótidos competidores específicos y mutantes sin marcar en un exceso de 100 o 300 veces la concentración molar de la sonda. Finalmente, las muestras se resolvieron en un gel de acrilamida al 6% y la interacción DNA-proteína se detectó mediante autoradiografía.

3.6. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Las células se incubaron con formaldehído al 1% durante 15 minutos a 33 °C en agitación para inducir la formación de enlaces covalentes en la cromatina, tras lo cual se lisaron en un tampón compuesto por Tris-HCl (50 mM, pH 8.0), EDTA (10 mM) y SDS al 1%, todo ello suplementado con inhibidores de proteasas. Los lisados obtenidos se sonicaron para generar fragmentos de cromatina de 300-600 pares de bases.

De los extractos sonicados, se tomaron 20 µl considerados como *input* para su posterior análisis por PCR. El resto (180 µl) se diluyó 10 veces en una solución de inmunoprecipitación, cuya composición es la siguiente: Tritón X-100 al 1%, EDTA (2 mM), Tris-HCl (20 mM, pH 8.0), NaCl (150 mM) e inhibidores de proteasas. A continuación se añadieron 160 µl de una solución A que contiene proteína A acoplada a cuentas de Sefarosa (50%), 10 µg de esperma de salmón sonificado, y 1 mg/ml de albúmina bovina. Todo ello se incubó durante 1 hora en agitación constante a 4°C. Transcurrido ese tiempo se centrifugó y se obtuvo un sobrenadante que se separó en varios tubos para llevar a cabo las inmunoprecipitaciones correspondientes. Para ello, se incubó cada muestra con 10 µl de los anticuerpos (anti-Twist, anti-E47, anti-USF1 y anti-USF2) o las IgG control durante 16 horas a 4 °C. Los complejos se recuperaron añadiendo a cada muestra 50 µl de la solución A. Una vez centrifugadas las muestras, las cuentas de Sefarosa-proteína A se lavaron 5 veces con distintas soluciones: la primera contiene Tritón X-100 al 1%, EDTA (2 mM), Tris-HCl (20 mM, pH 8.0), NaCl (150 mM) e inhibidores de proteasas. El segundo lavado se hizo con una solución similar que contiene NaCl (500 mM). La solución utilizada para el tercer lavado contiene LiCl (0.25 M), Igepal al 1%, desoxicolato sódico al 1%, EDTA (1 mM) y Tris-HCl (10 mM, pH 8.0). Por último las muestras se lavaron dos veces con una solución de TE compuesta por Tris-HCl (10 mM, pH 8.0) y EDTA (1 mM). Los complejos se eluyeron incubándolos con 500 µl de SDS al 1% en NaHCO₃ (0.1 M), a temperatura

ambiente durante 30 minutos. Tanto los complejos inmunoprecipitados como el *input* se incubaron durante 16 horas a 65 °C en presencia de NaCl (0.2 M) para revertir la unión proteína-DNA. A continuación, las muestras se incubaron con proteinasa K (Sigma) durante 1h a 45 °C. El DNA se extrajo con fenol-cloroformo, se precipitó con etanol en presencia de 2 µg de glicógeno a -20 °C durante 16 horas, se resuspendió en 10 µl de agua, y se empleó para la amplificación del fragmento del promotor de *Alx3* comprendido entre los nucleótidos -202 a +88 que contiene dos cajas E. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados es la siguiente:

AlxX202S: 5'-CACTCGAGGAGCCAAGGACTCACCCGAC-3'
AlxHAS1: 5'-CAAAGCTTTGTGAGCCAAGGGGGAGGGA-3'

La sensibilidad de la PCR se evaluó con diluciones seriadas del *input* y las condiciones utilizadas fueron: 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de: 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 65 °C y 1 minuto a 72 °C. Tras finalizar el último ciclo las muestras se mantuvieron durante 5 minutos a 72 °C.

3.7. RT-PCR en células RC2.E10 .

Las células RC2.E10 se sembraron en placas de cultivo de 100 mm de diámetro a una densidad de 5 x 10⁵ células por placa y se mantuvieron en ausencia de ácido fólico, o se trataron con ácido fólico (10 µM) durante 24 horas, transcurridas las cuales se procedió a la extracción del RNA total con *TriReagent* (Molecular Research Center).

A continuación, se hibridó 1 µg de RNA con oligo-(dT)₁₅ y se incubó con la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT) para sintetizar cDNA. La amplificación por PCR a partir de los cDNAs obtenidos se llevó a cabo con la polimerasa Taq. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Nombre	Oligonucleótido directo (5'-3')	Oligonucleótido inverso (5'-3')
r-Alx3	GGCATCCCCTCTCCATGTATG	CAAAAGTGAGGCCAGACC
r-Actina	GACGATATGGAGAAGATTTGGCA	CCATCTCTTGCTCGAAGTCTAGG
r-Twist	ATTCAGACCCTCAAAGTGGCGG	TCACTGACTGATTGGCAAGAC

Las condiciones de PCR fueron: 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos y una incubación a 72 °C durante 5 minutos para la amplificación de *Alx3* y *Twist*; 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 25 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos y una incubación a 72 °C durante 5 minutos para la amplificación de *Actina*.

3.8. Animales.

Se emplearon ratones silvestres (*Alx3*^{+/+}) o carentes de *Alx3* (*Alx3*^{-/-}) de la cepa híbrida C57BL/6 x FVB. Los ratones carentes de *Alx3*, generados por recombinación homóloga, fueron proporcionados por el Dr. Frits Meijlink (Netherlands Institute of Developmental Biology, Utrecht, Holanda) (Beverdam y Meijlink, 2001).

Para el genotipado de los ratones utilizamos el kit comercial *REDEExtract-N-AmpTMTissue PCR kit* (Sigma). Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR fueron los siguientes:

Nombre	Oligonucleótido directo (5'-3')	Oligonucleótido inverso (5'-3')
Alx3	GAGGCTCAAGAACAAAGGAAGGA	CTAGGAGCAGGTCAGAGCAGGAAG
lacZ	TCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAAT	AGACCAACTGGTAATGGTAGCGAC

Las condiciones de PCR fueron: 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C (para *lacZ*) o 57 °C (para *Alx3*) durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos y una incubación a 72 °C durante 5 minutos.

3.8.1. Dietas.

Se utilizó pienso estándar (Safe-diets A04; Panlab) para alimentar a todos los ratones, excepto a aquellos que fueron utilizados en experimentos diseñados para estudiar los efectos de una dieta exenta de ácido fólico. En este caso, se utilizaron piensos comerciales (Safe-diets A04, Panlab) preparados sin o con ácido fólico (0.5 mg/kg, concentración similar a la del pienso estándar) a los que se añadió succinilsulfatiazol al 1%, un antibiótico que elimina las bacterias del tracto digestivo que sintetizan folatos (Burgoon et al., 2002).

3.8.2. Test de tolerancia a glucosa (GTT).

Se utilizaron hembras vírgenes o preñadas (8.5 días de gestación) de una edad comprendida entre 5 y 6 semanas, mantenidas en ayuno durante 16 horas. Pasadas las mismas se tomó una gota de sangre mediante una punción en la cola para determinar los niveles basales de glucemia con ayuda de un glucómetro (Roche). Tras ello se administró una solución de glucosa (2 g/kg i.p.) para volver a determinar la glucemia 15, 60 y 120 minutos después de la inyección.

3.8.3. Inducción de hiperglucemia gestacional.

Se siguieron las indicaciones de Fine et al. (1999) con algunas modificaciones. Se utilizaron ratones hembra de una edad comprendida entre 5 y 6 semanas inyectadas con una dosis diaria de estreptozotocina (75 mg/kg i.p.) (Sigma) durante 4 días. La estreptozotocina se disolvió en una solución tamponada de citrato sódico (10 mM) y NaCl al 0.9% (pH 4.5) inmediatamente antes de su administración. Posteriormente, los niveles de glucosa en sangre obtenidos por punción de la cola se monitorizaron utilizando un glucómetro (Roche) durante intervalos regulares. La diabetes inducida en estos animales se controló mediante la implantación subcutánea de cápsulas de insulina (LinShin). El número de cápsulas implantadas en cada animal se determinó según la siguiente tabla:

Glucemia (mg/dl)	Número de Cápsulas
250-350	1
350-450	2
>450	3

En estas hembras se alcanzó la estabilización normoglucémica (~ 100 mg/dl) aproximadamente a las tres semanas de la implantación de la cápsula. Tras ello, estas hembras se pusieron a cruce con un macho no diabético. La mañana en la que se detectó el tapón vaginal se consideró el día 0.5 de la gestación. Estas hembras desarrollaron de nuevo hiperglucemia a partir del día 3.5 de la gestación. El sacrificio y extracción de los embriones se realizó en el día 10.5 de gestación (Figura 7).

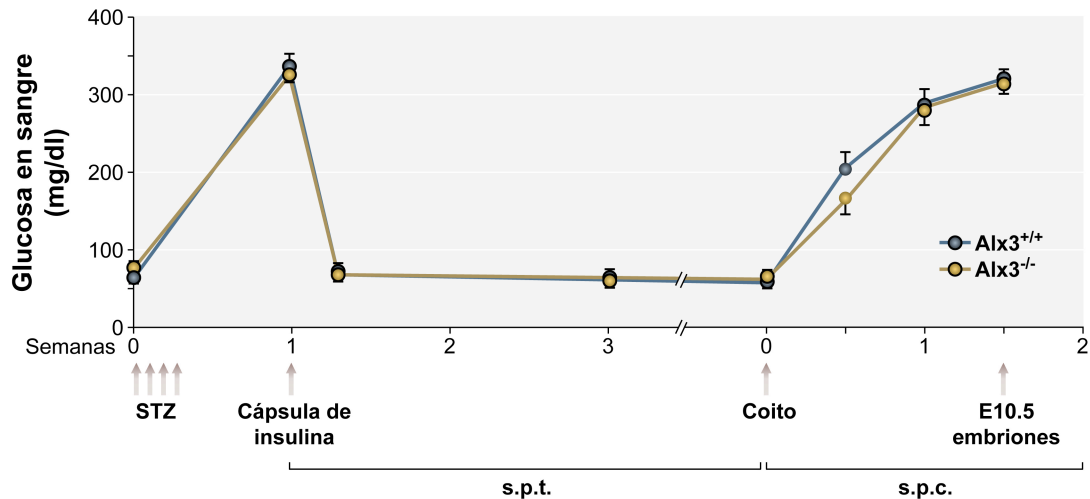


Figura 7: Inducción de hiperglucemia gestacional. La gráfica muestra el aumento de los niveles de glucosa en sangre tras las inyecciones de estreptozotocina 75 mg/kg i.p. (STZ), su recuperación a niveles basales mediante la implantación de cápsulas de insulina, y su posterior incremento tras el coito como consecuencia del inicio de la gestación. s.p.t: semanas postratamiento con STZ. s.p.c.: semanas postcoito.

Un grupo de estos animales se trató con ácido fólico (3 mg/kg i. p.) (Sigma) administrado una vez al día desde el día 0.5 hasta el día 10.5 de gestación.

3.9. RT-PCR cuantitativa en embriones de ratón.

Las determinaciones por RT-PCR cuantitativa se realizaron en la unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid a partir de RNA obtenido de embriones (E9.5 o E10.5) mediante un kit *Illustra RNAspin kit* (GE Healthcare). *Alx3* se determinó con una sonda Taqman (Mm00431779_m1) en solución *TaqMan universal PCR master Mix, No Amp Erase UNG* (Applied Biosystems) en un termociclador *7900HT fast real-time PCR* (Applied Biosystems). La expresión de otros genes se monitorizó utilizando, un método de detección con *SYBR green*. El ensayo se llevó a cabo en una solución *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) con los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 3, usando un equipo *ABI7900HT Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). En ambos casos, los experimentos se realizaron por triplicado y los valores obtenidos se normalizaron frente a los niveles de mRNA de *GAPDH*.

Tabla 3: Oligonucleótidos diseñados para RT-PCR (SYBR green)

Nombre	Oligonucleótido directo (5'-3')	Oligonucleótido inverso (5'-3')
m-p53	ACATGACGGAGGTCGTGAGA	TTTCCTTCCACCCGGATAAG
m-DNMT3a	GCCGAATTGTGTCTTGGTGGATGACA	CCTGGTGAATGCACTGCAGAAGGA
m-Cited2	ACCATCACCTGCCACC	CGTAGTGATGTGCTCGCCCA
m-Hif1 α	CAGTACAGGATGCTTGCCAAA	ATACCACTTACAACATAATTCACACACACA
m-BMP4	CGAGCCAACACTGTGAGGAGT	AGGTTGAAGAGGAAACGAAAAGC
m-Pax3	AGACAGCTTTGTGCCTCCAT	AGTCGGTCTGAGGCTGGTG
m-GPX-1	CCTCAAGTACGTCCGACCTG'	CAATGTCGTTGCGGCACACC
m-Gnc5	AGTTGTGCCGTAGCTGTGAG	TGGTGTCTGTGTCTCTTCC
m-VEGFB	GACGATGGCCTGGAATGT	GGTACTGGATCATGAGGATCTG
m-Mn-SOD	GCACATTAACGCGCAGATCA	AGCCTCCAGCAACTCTCCTT
m-Catalasa	GCAGATACCTGTGAAGTGTG	GTAAGATGTCCGCACCTGAG
m-PDGFR α	GACGAGTGTCTTCGCCAAAGTG	CAAAATCCGACCAAGCACGAGG
m-NOS	CCTGTGGGAGTCTGCTTGGC	GTGTCAGAGATGCTGCGGTA
m-AP2	GTGTCAGAGATGCTGCGGTA	TGAGGATGGTGTCCACGTA
m-FoxO1	TATTGAGCGCTTGGACTGTG	TATTGAGCGCTTGGACTGTG
m-FoxO4	TGTAACAGGTCCTCGGAAGG	CTGTGCAAGGACAGGTTGTG
m-Folr1	CACAAGGGATGGAAGTGGTC	TGGGGAAGTAGAAGGTGAAGG

3.10. Hibridación *in situ* en embriones de ratón.

Los embriones se disecaron en PBS y se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 16 horas a 4 °C. A continuación, se lavaron en PBST (PBS con Tween-20 al 0.1%), se deshidrataron gradualmente en concentraciones crecientes de metanol en PBST y se guardaron a -20 °C hasta su utilización. Posteriormente, los embriones se rehidrataron en concentraciones decrecientes de metanol en PBST, disminuyendo la proporción de metanol hasta eliminarlo completamente. Después, se lavaron durante 10 minutos en PBST y se trataron con proteinasa K (10 µg/ml) durante 7-8 minutos. A continuación, los embriones se lavaron de nuevo dos veces más en PBST durante 5 minutos para volver a fijarlos durante 20 minutos en paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.1% en PBS. Después, los embriones se lavaron dos veces en PBST y, a continuación, se incubaron en agitación durante 3 horas a 70 °C en una solución de prehibridación compuesta por formamida al 50%, SSC (1.3X, pH 4.5), tRNA (50 µg/ml), CHAPS al 0.5%, heparina (100 µg/ml), EDTA (5 mM, pH 8.0) y Tween-20 al 0.2%. A continuación se hibridaron durante una noche a 70 °C en la misma solución pero con las ribosondas correspondientes que previamente habían sido desnaturalizadas durante 5 minutos a 80 °C. Al día siguiente, se lavaron dos veces con la solución de hibridación a 70 °C, una vez con una mezcla 1:1 de solución de hibridación-MABT [ácido málico (100 mM), NaCl (150 mM) y Tween-20 al 0.1%, pH

7.5] y tres veces más con MABT a temperatura ambiente. Posteriormente se bloquearon durante 2 horas en suero de oveja al 20% en MABT y solución Boehringer al 2%. Después, los embriones se incubaron durante una noche a 4 °C en la misma solución a la que se había añadido un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (1:2000) (Roche). Al día siguiente, los embriones se lavaron en la solución MABT con sucesivos cambios durante 5 horas. Finalmente, se lavaron en solución NTMT compuesta por NaCl (100 mM), Tris-HCl (0.1 M, pH 9.5), MgCl₂ (50 mM) y Tween-20 al 1%. Las sondas hibridadas se detectaron mediante la incubación con los sustratos cloruro de 4-nitrozultetrazolio (NBT, 75 mg/ml) y 5-bromo-4-cloro-3 indolil fosfato (BCIP, 50mg/ml) (Roche), después de lo cual los embriones fueron lavados dos veces durante 5 minutos en PBST, refijados en paraformaldehído al 4% en PBS y guardados a 4 °C.

Para la síntesis de las ribosondas sentido y antisentido, se utilizaron fragmentos de cDNA generados por PCR. Los productos de PCR fueron purificados y se incubaron con las RNA polimerasas SP6 y T7, respectivamente, utilizando en la reacción una mezcla de ribonucleótidos que contiene ATP, GTP, CTP, UTP y UTP-digoxigenina. La secuencia de los oligonucleótidos que se usaron fueron las siguientes:

Oligonucleótidos	Alx3
directo (5'-3')	GAATTTAGGTGACACTATAGAAAGCGTGAGCGTTATGGGAAGA
inverso (5'-3')	TGTAATACGACTCACTATAGGGTGAAACGAGGCTTGGGGACTT
	Alx4
directo (5'-3')	GAATTTAGGTGACACTATAGAAGCATGGACAACAGCTACCTCAGTG
inverso (5'-3')	TGTAATACGACTCACTATAGGCAGGATGGGTCTCTGAATCTGGG
	Cart1
directo (5'-3')	GAATTTAGGTGACACTATAGAAGACAGCAGCGTGAACATATGGAATC
inverso (5'-3')	TGTAATACGACTCACTATAGGGCATGACGTAACCACAGAACCAC
	Twist
directo (5'-3')	GAATTTAGGTGACACTATAGAAGACTCTGGAGCTGG
inverso (5'-3')	TGTAATACGACTCACTATAGGATGATTGCAGGCCA

3.11. Tinción de β -galactosidasa.

Los embriones se diseccionaron en PBS, se fijaron durante 5 minutos en paraformaldehído al 1% y glutaraldehído al 0.2%, se lavaron y se tiñeron según las indicaciones de Verma-Kurvari et al. (1996). Después de la tinción, los embriones fueron postfijados en paraformaldehído al 4%.

3.12. Ensayo TUNEL e histología.

Los embriones se fijaron con una solución de paraformaldeído al 4% en PBS durante 16-20 horas, tras lo cual se lavaron dos veces con PBS y se conservaron en sacarosa (20%) a 4 °C. A continuación se embebieron en resina *Tissue-Tek O.C.T.* (Ted Pella) a -20 °C, hasta su congelación, tras lo cual las muestras se procesaron en un criostato *Leica Cryocut 1900* para generar secciones de 10 µm de grosor. Las secciones se montaron y se conservaron a -20 °C en portaobjetos de cristal Superfrost.

Los ensayos TUNEL o de apoptosis se llevaron acabo en las anteriores secciones siguiendo las instrucciones del fabricante del kit *ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection* (Chemicon International). La inmunodetección se llevó acabo usando diaminobenzidina. Como tinción de contraste se utilizó la hematoxilina.

Resultados



4. RESULTADOS.

4.1. *Alx3* y desarrollo craneal.

4.1.1. La carencia de *Alx3* no altera la expresión de genes importantes para el desarrollo craneofacial.

Para determinar si la deficiencia de *Alx3* produce un cambio en el patrón de expresión de los genes con los que se coexpresa (*Twist*, *Cart1* y *Alx4*), llevamos a cabo experimentos de hibridación *in situ*.

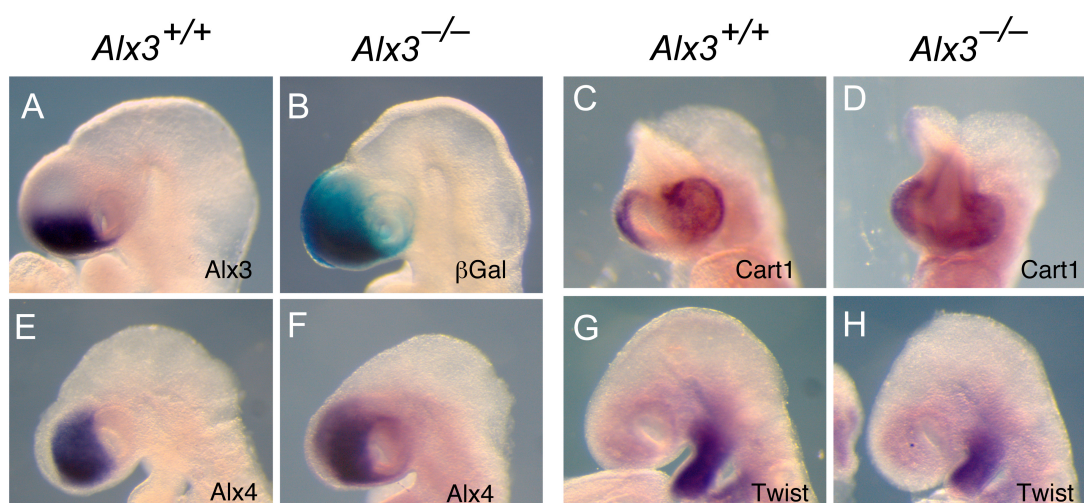


Figura 8: Patrón de expresión de *Alx3*, *Alx4*, *Cart1* y *Twist* en embriones *Alx3*^{-/-} o silvestres. A, Hibridación *in situ* realizada sobre embrión silvestre de 18 somitas con una sonda específica para el mRNA de *Alx3*. B, Tinción β-galactosidasa que confirma que el patrón de expresión de *lacZ* en los embriones *Alx3*^{-/-} es similar al observado en los embriones silvestres. C-H, Hibridación *in situ* realizada con sondas específicas para *Cart1* (C y D), *Alx4* (E y F) o *Twist* (G y H) en embriones silvestres (C, E y G) o embriones *Alx3*^{-/-} (D, F y H).

Los ratones *Alx3*^{-/-} tienen sustituido parte del gen *Alx3* por el gen *lacZ* (Beverdam y Meijlink, 2001). Por lo tanto, pudimos monitorizar el patrón de expresión de *Alx3/lacZ* en los embriones *Alx3*^{-/-}, mediante una tinción de β-galactosidasa. Comprobamos que el patrón de expresión de los alelos mutantes *Alx3/lacZ* es similar al patrón de expresión de *Alx3* observado en los embriones silvestres (Figura 8A y 8B), lo cual indica que la carencia de la homeoproteína *Alx3* no altera los mecanismos de expresión del gen que la codifica. Por otro lado, como podemos observar en la Figura 8C-H, el patrón de expresión de *Alx4*, *Cart1* y *Twist* no se ve alterado en ausencia de *Alx3*. Estos resultados indican que los defectos producidos por la carencia de *Alx3* no se deben a alteraciones secundarias en la expresión de estos genes.

4.1.2. La carencia de *Alx3* incrementa la apoptosis en la región craneofacial.

Habida cuenta que los defectos del cierre del tubo neural debidos a la carencia de genes relacionados con *Alx3* (*Cart1*, *Twist* y *Pax3*) se asocian con una elevada muerte celular en el mesénquima craneal (Chen y Behringer, 1995; Zhao et al., 1996; Phelan et al., 1997), decidimos analizar si la carencia de *Alx3*^{-/-} se acompaña también de un incremento en la población de células apoptóticas en este tejido. Con este objetivo realizamos ensayos TUNEL sobre embriones *Alx3*^{+/+} y *Alx3*^{-/-} con un grado de desarrollo equivalente (12 somitos).

Observamos que los embriones *Alx3*^{-/-} presentan un número anormalmente elevado de células apoptóticas en la región rostral del mesénquima de la cabeza (Figura 9E). Además, se observó un aumento de la muerte celular en la superficie dorsal del neuroepitelio al nivel del mesencéfalo cuando éste está anormalmente evaginado como consecuencia del fallo del cierre del tubo neural (Figura 9F). Como *Alx3* no se expresa en esta región, este incremento de células apoptóticas se puede deber a un efecto indirecto en el neuroepitelio anormalmente expuesto al exterior (Schorle et al., 1996).

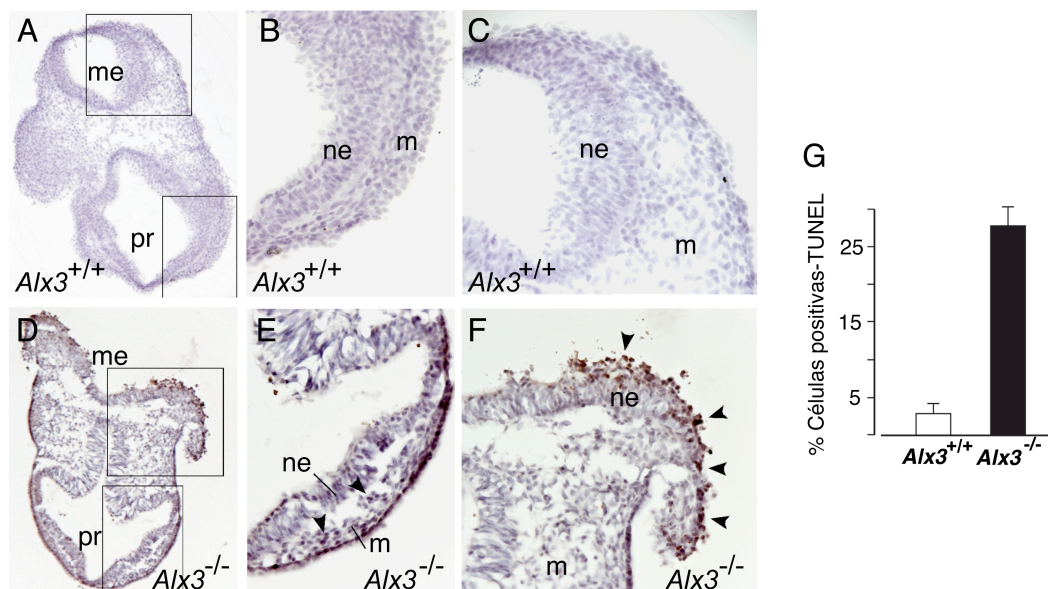


Figura 9: Incremento de la muerte celular en la región craneofacial en embriones *Alx3*^{-/-}. Sección representativa de la cabeza de un embrión *Alx3*^{+/+} (A) o de un embrión *Alx3*^{-/-} (D) procesada mediante ensayo TUNEL. Los recuadros corresponden a imágenes ampliadas que se muestran en los paneles B, C y E, F, respectivamente. Las puntas de flecha en E y F indican ejemplos de células apoptóticas. G, Cuantificación del número de células positivas para el TUNEL en la región del mesénquima craneal de secciones histológicas similares a las mostradas en los paneles B y E. Los valores representan la media \pm error típico de 4-6 secciones de 2 embriones de cada genotipo. pr, prosencéfalo; m, mesénquima; me, mesencéfalo; ne, neuroepitelio.

La existencia de un número anormalmente elevado de células apoptóticas en los embriones carentes de *Alx3* tiene como consecuencia una significativa disminución de la densidad celular del mesénquima craneofacial, como pusimos de manifiesto mediante el conteo del número de células detectadas en secciones histológicas (Figura 10H-J). Por otro lado, como podemos ver en la Figura 10H, los embriones *Alx3*^{-/-} presentan una mayor abundancia de células sanguíneas que los embriones silvestres, lo cual sugiere la existencia de un aumento del tamaño de las cavidades vasculares en el mesénquima craneal de los embriones *Alx3*^{-/-} (Figura 10A-C).

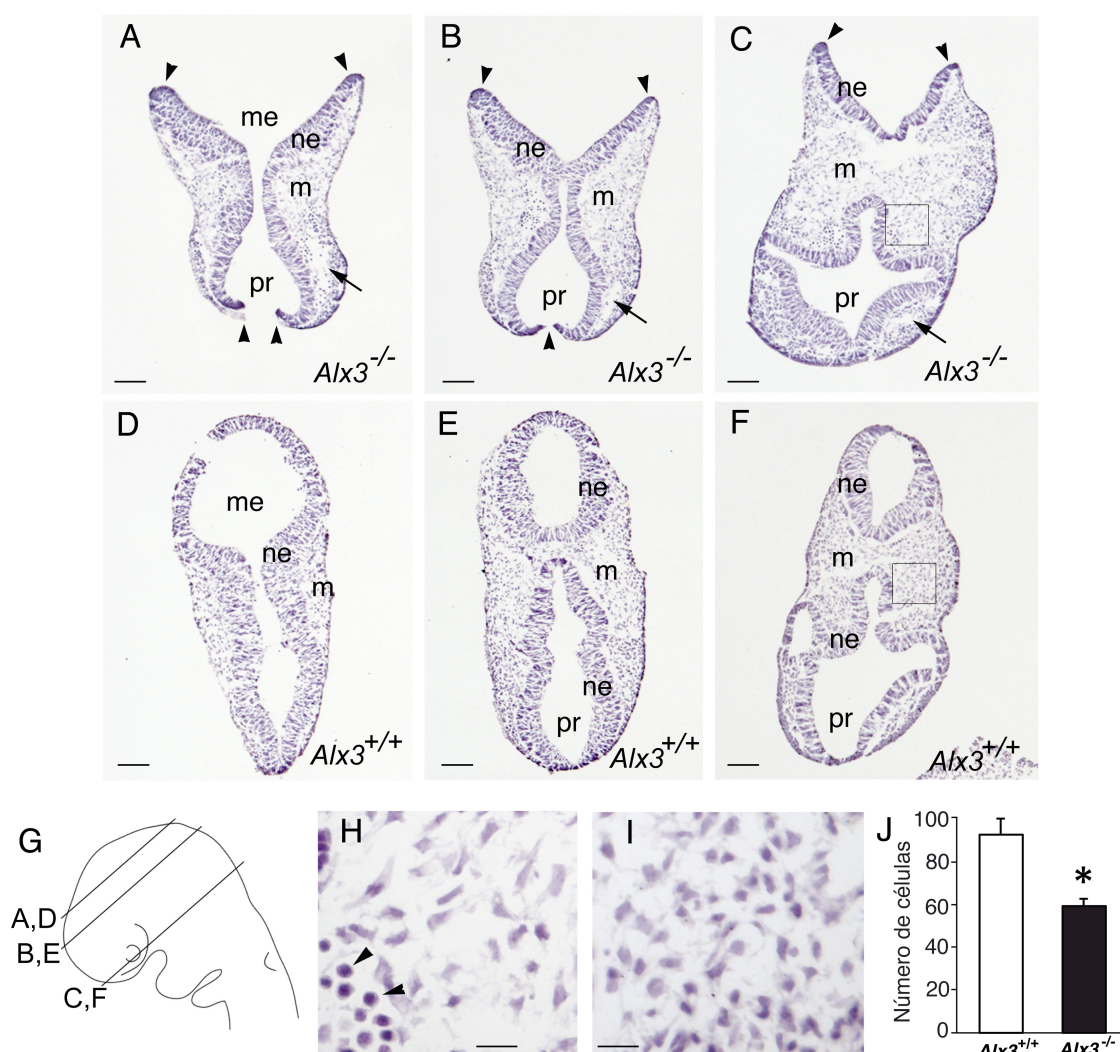


Figura 10: Alteraciones en el mesénquima craneofacial de embriones *Alx3*^{-/-}. A-F, Secciones de la cabeza de embriones *Alx3*^{-/-} (A-C) o silvestres (D-F) de 20 somitos teñidas con hematoxilina. La localización de las secciones se indica en el panel G. Los pliegues neurales no fusionados se indican mediante puntas de flecha. Se analizaron 5 embriones de cada genotipo. Las flechas indican zonas del mesénquima craneal con menor densidad celular. Los recuadros en los paneles C y F corresponden a las regiones ampliadas en H e I, respectivamente. La densidad celular en el mesénquima (J) se calculó contando el número de núcleos en regiones del mismo tamaño y localización que las mostradas en los paneles H e I. * $p < 0.004$ (Test de la t de Student). La presencia de células sanguíneas en los embriones *Alx3*^{-/-} se indica con puntas de flecha en el panel H. Las barras de escala representan 100 μ m (A-F) o 20 μ m (H e I). pr, prosencéfalo; m, mesenquima; me, mesencéfalo; ne, neuroepitelio.

Estos resultados indican que los defectos en el cierre del tubo neural craneal en los embriones carentes de *Alx3* se asocian a una alteración del mesénquima que compromete su expansión, ya que éste se reconoce como un aspecto esencial para el normal desarrollo de la región craneofacial (Morris y Solursh, 1978; Schorle et al., 1996; Copp et al., 2003).

4.1.3. La expresión de *Alx3* depende de la disponibilidad de ácido fólico *in vivo*.

Con el fin de evaluar la existencia de una posible relación entre la disponibilidad del ácido fólico y los niveles de expresión de *Alx3 in vivo*, utilizamos hembras alimentadas con una dieta carente de ácido fólico antes y durante la gestación. En concordancia con estudios anteriores (Burgoon et al., 2002), encontramos un descenso en el éxito reproductor de las hembras gestantes alimentadas con esta dieta (n=25), ya que el 64% de las mismas presentaron reabsorciones uterinas completas, mientras que la incidencia en las hembras alimentadas con la dieta control fue del 40% (n=20). En las hembras que contenían embriones viables, se analizó la incidencia de los defectos del tubo neural a los 9.5 días de gestación. Se obtuvieron un total de 37 embriones *Alx3^{+/+}* de madres alimentadas con una dieta carente de ácido fólico. De éstos, 7 se desarrollaron normalmente hasta alcanzar 13-19 somitos, mientras que el resto de los embriones mostraban un severo retraso en el desarrollo, manifestado por la presencia de no más de 6-7 somitos (Tabla 4).

Sólo se obtuvieron 11 embriones *Alx3^{-/-}* procedentes de madres alimentadas con la dieta deficiente en ácido fólico. En este grupo, no se pudieron analizar los defectos del cierre del tubo neural porque en todos ellos se observó un significativo retraso (presentaban menos de 7 somitos). Cabe destacar, que uno de éstos embriones se encontraba seriamente malformado. Por lo tanto, el uso de una dieta deficiente en ácido fólico impidió la generación y desarrollo de embriones carentes de *Alx3*.

Por otro lado, el 30% de los embriones *Alx3^{-/-}* cuyas madres habían sido alimentadas con la dieta control, presentaban un fallo en el cierre del tubo neural (Tabla 4). Estos datos están en concordancia con los obtenidos en estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio (Lakhwani et al., 2010).

Tabla 4. Número y fenotipo de embriones *Alx3*^{+/+} o *Alx3*^{-/-} de E9.5 extraídos de madres alimentadas con una dieta deficiente de ácido fólico (-AF) o una dieta control (+AF).

Genotipo	Dieta -AF			Dieta + AF		
	<12 somitos	12-22 somitos		<12 somitos	12-22 somitos	
		Tubo neural abierto	Tubo neural cerrado		Tubo neural abierto	Tubo neural cerrado
<i>Alx3</i> ^{-/-}	11	0	0	0	8	26
<i>Alx3</i> ^{+/+}	30	0	7	0	0	25

Utilizando RNA obtenido de aquellos embriones cuyo desarrollo no se había visto afectado por la carencia de ácido fólico en la dieta de sus madres, observamos que los niveles de mRNA de *Alx3* en estos embriones están significativamente reducidos en comparación con los observados en aquellos cuyas madres habían sido alimentadas con una dieta normal (Figura 11). Por tanto, estos datos confirman que la expresión de *Alx3* es dependiente de la disponibilidad del ácido fólico *in vivo*.

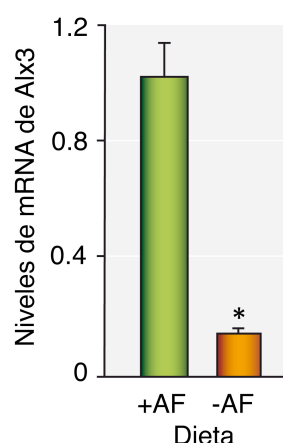


Figura 11: La expresión de *Alx3* depende de la disponibilidad del ácido fólico *in vivo*. Niveles relativos de mRNA de *Alx3* detectados en embriones *Alx3*^{+/+} de E9.5 (17-18 somitas) extraídos de madres alimentadas con una dieta control con ácido fólico (+AF, n=5) o con una dieta deficiente en ácido fólico (-AF, n=3) determinados mediante RT-PCR cuantitativa. *p<0.0005 (Test de la t de Student).

4.2. Regulación transcripcional de la expresión de *Alx3*.

4.2.1. Análisis funcional de regiones reguladoras del promotor de *Alx3*.

Con el objeto de identificar regiones del promotor de *Alx3* que pudieran ser responsables de su activación transcripcional en respuesta a ácido fólico, se llevaron a cabo transfecciones transitorias en células RC2.E10. Como se puede observar en la Figura 12, en células mantenidas en ausencia de ácido fólico, los plásmidos que contienen los fragmentos del promotor de *Alx3* correspondientes a las delecciones 5' en los nucleótidos -1506, -750, -490 y -202 generan una actividad luciferasa relativamente elevada, mientras que la actividad producida por el resto se mantiene en niveles basales. Sin embargo, el tratamiento con ácido fólico no estimuló la expresión de ninguno de estos plásmidos,

lo cual indica que la región responsable de la activación transcripcional en respuesta a ácido fólico no se encuentra en este fragmento de 2.7 kb del promotor.

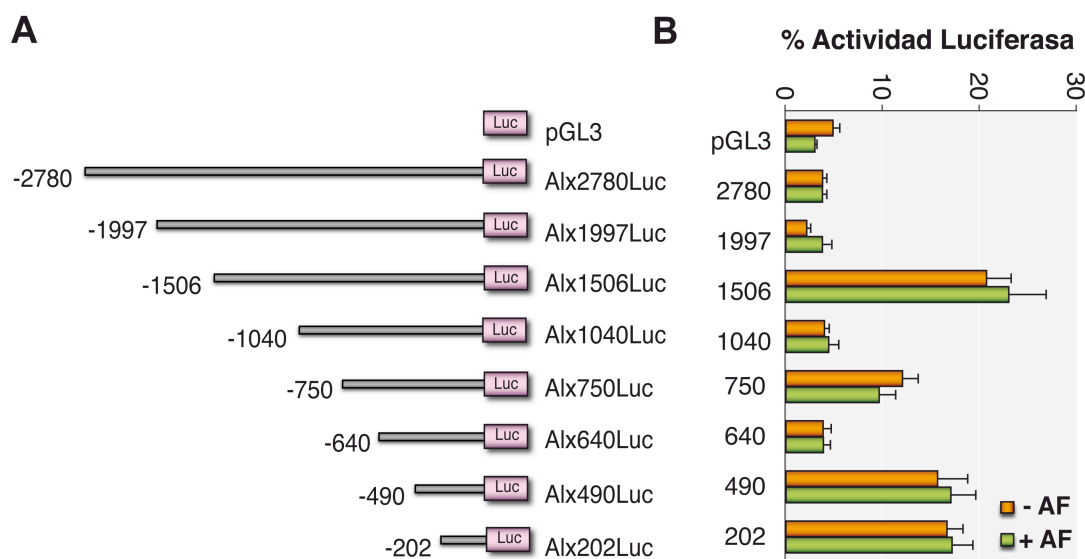


Figura 12: Análisis funcional del promotor de *Alx3*. A, Representación esquemática de versiones truncadas en el extremo 5' del promotor de *Alx3* fusionadas al gen de luciferasa en pGL3-Basic. B, Niveles de actividad luciferasa en células RC2.E10 transfectadas con los plásmidos indicados en A o con el vector vacío pGL3, con o sin ácido fólico (10 µM). AF: ácido fólico.

En vista de estos resultados, consideramos la posibilidad de que los elementos de respuesta a ácido fólico pudieran encontrarse en alguna de las UPRs identificadas mediante análisis *in silico* (véase Material y Métodos). Como se puede observar en la Figura 13B, en ausencia de ácido fólico sólo la UPR7 produce un aumento discreto de la actividad luciferasa en relación con la actividad observada con Alx202Luc. Además, el tratamiento con ácido fólico no estimuló la expresión de ninguno de estos plásmidos, lo cual refleja la ausencia de posibles elementos reguladores de respuesta a ácido fólico en estas regiones.

Finalmente, se identificó en la región proximal del primer intrón (nucleótidos 894 a 1339, en relación con su extremo 5' una región de 445 pares de bases cuya secuencia se encuentra muy conservada en diferentes especies que coincide con una isla CpG, compatible con la existencia de un posible elemento regulador como se ha descrito en algunos intrones de otros genes (Zimmerman et al., 1994; Magklara y Smith, 2009). En células RC2.E10 transfectadas, comprobamos que la presencia de este fragmento intrónico no altera la actividad luciferasa y la adición de ácido fólico no tuvo ningún efecto (Figura 14).

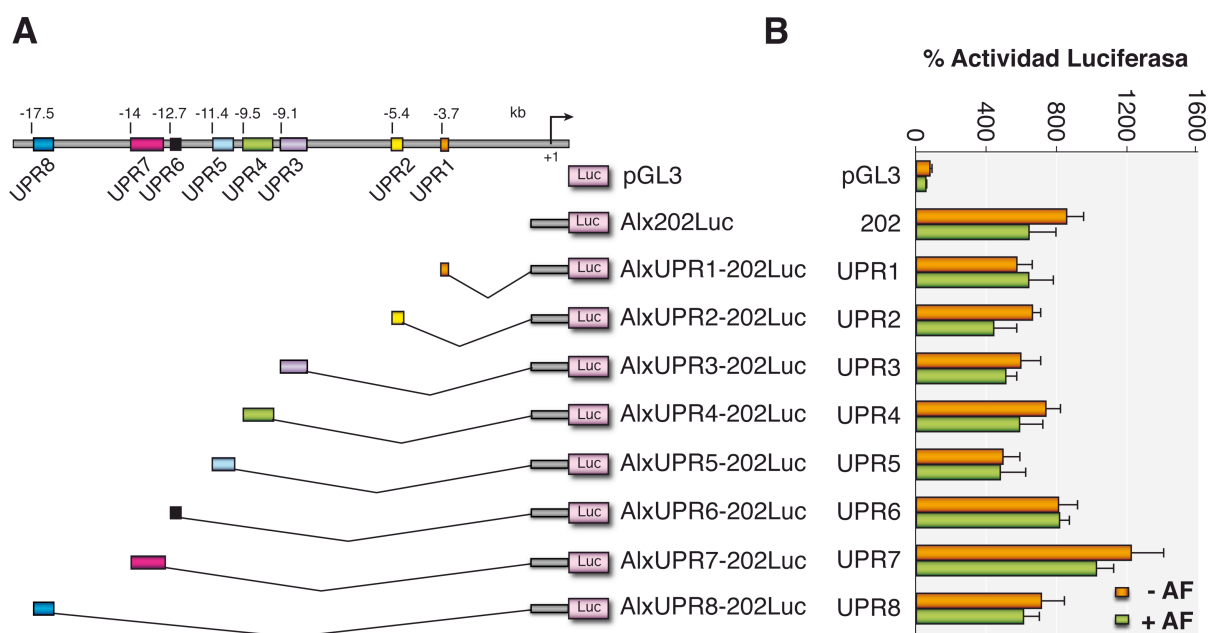


Figura 13: Análisis funcional de las UPRs de *Alx3*. A, Representación esquemática de los diferentes fragmentos correspondientes a las UPRs clonados en el extremo 5' de *Alx202Luc*. B, Niveles de actividad luciferasa en células RC2.E10 transfectadas con los plásmidos indicados en A, con o sin ácido fólico (10 μ M). AF: ácido fólico.

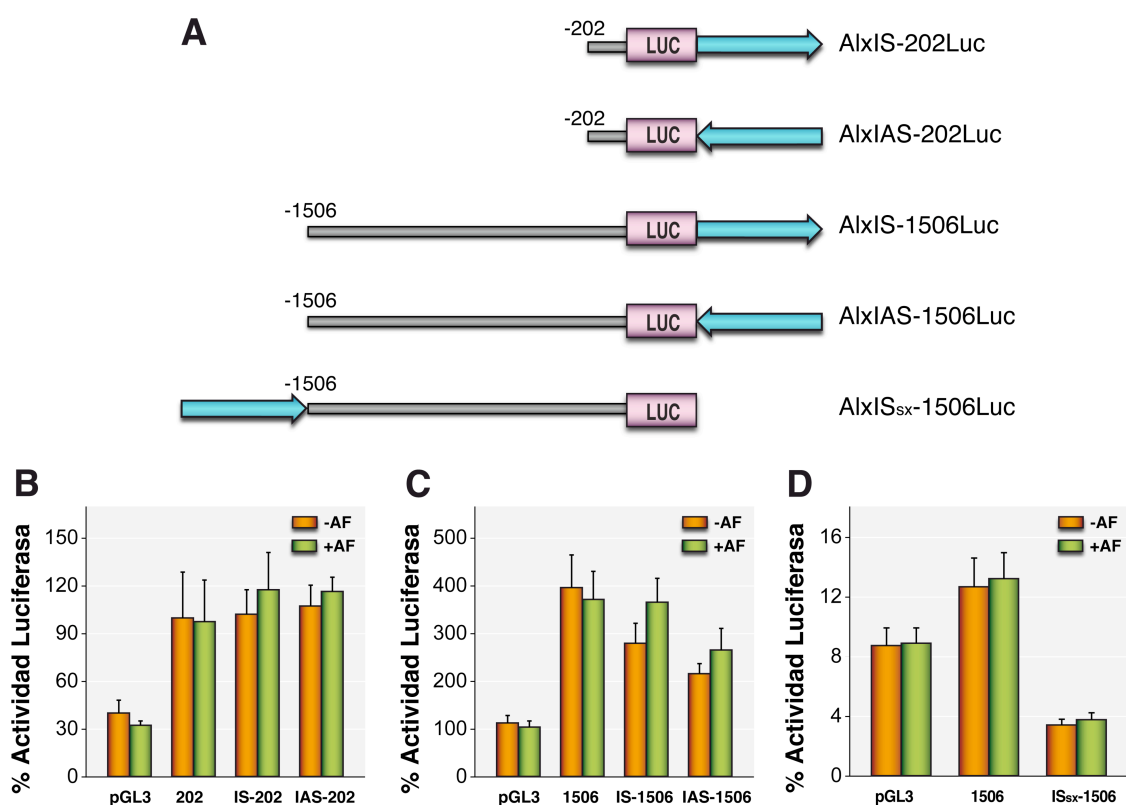


Figura 14: Análisis funcional de la región 5' del primer intrón de *Alx3*. A, Representación esquemática de los distintos plásmidos generados al clonar en diferentes posiciones la región conservada (Azul) en *Alx202Luc* y *Alx1506Luc*. B, C y D, Niveles de actividad luciferasa generados en células RC2.E10 transfectadas con *AlxIS-202Luc* y *AlxIAS-202Luc* (B), *AlxIS-1506Luc* y *AlxIAS-1506Luc* (C), *AlxISsx-1506Luc* (D) o pGL3, en ausencia de ácido fólico o en presencia de este (10 μ M). AF: ácido fólico.

En su conjunto, estos experimentos indican la ausencia de elementos de respuesta a ácido fólico en las regiones analizadas.

4.2.2. Regulación transcripcional de *Alx3* por *Twist*.

Existen evidencias indirectas que sugieren que *Twist* es un factor importante en la regulación transcripcional de *Alx3* *in vivo* (Loebel et al., 2002). De acuerdo con esta idea, comprobamos mediante RT-PCR que *Twist* se coexpresa con *Alx3* en células RC2.E10 (Figura 15).

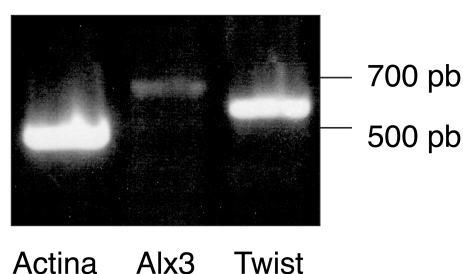


Figura 15: Análisis de la expresión de *Twist* y *Alx3* en células RC2.E10 mediante RT-PCR. Como control positivo del experimento analizamos la expresión de *Actina*.

A continuación, realizamos una búsqueda de potenciales sitios de unión de *Twist* en un fragmento de 3 kb del promotor de *Alx3* próximo al sitio de inicio de la transcripción usando el programa *Transfac* y encontramos 10 cajas E canónicas (CANNTG). Dos de ellas se localizan en las posiciones -42 a -37 (Eb1) y -127 a -122 (Eb2) con respecto al sitio de inicio de la transcripción, dentro de la región más pequeña del promotor con actividad transcripcional (-202/+88) (Figura 16A). Por todo esto, procedimos a llevar a cabo un análisis funcional de estas cajas, que están contenidas en el plásmido *Alx202luc*, para lo cual mutamos cada una de ellas por separado.

El efecto de cada uno de estos mutantes se evaluó en células RC2.E10 mediante transfecciones transitorias. Observamos que la mutación de la caja Eb1 o de la Eb2 disminuye significativamente la actividad transcripcional de *Alx202Luc* de manera independiente (Figura 16B). Esto nos indica que tanto la caja Eb1 como la Eb2 son elementos reguladores importantes en el promotor de *Alx3*.

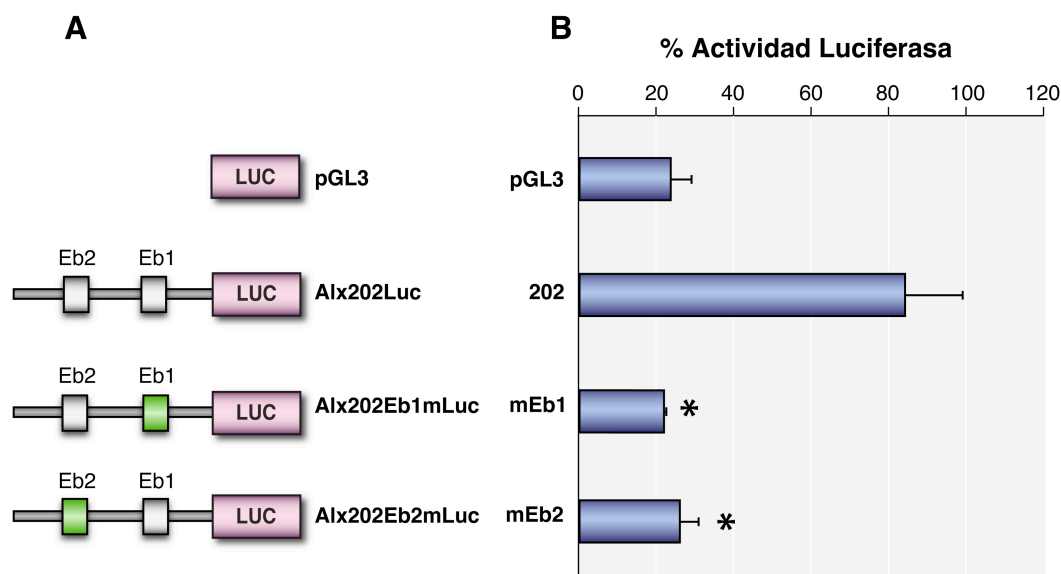


Figura 16: Análisis funcional de la contribución de las cajas E a la actividad transcripcional del promotor *Alx3*. A, Representación esquemática de los plásmidos utilizados en la que se indica la posición relativa de las cajas Eb1 y Eb2. El color verde indica la mutación de la secuencia de cada caja. B, Niveles de actividad luciferasa en células RC2.E10 transfectadas con las distintos plásmidos mutados, Alx202Luc o pGL3. * $p < 0.01$ con respecto a la actividad generada por Alx202Luc (Test de la t de Student).

Para determinar si Twist se une a la región del promotor de *Alx3* endógeno que contiene estas dos cajas, llevamos a cabo ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en células RC2.E10. Como se puede apreciar en la Figura 17A, se amplificó el fragmento que corresponde a esta región a partir de la cromatina inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-Twist. Además, comprobamos que E47, que tiene la capacidad de formar heterodímeros con Twist (Spicer et al., 1996; Hamamori et al., 1997; Verzi et al., 2002) se une a esta región del promotor (Figura 17B).

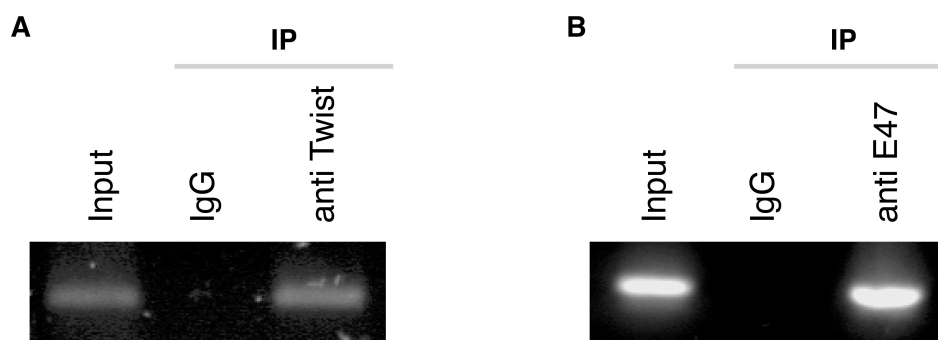


Figura 17: Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina que indican la unión de Twist y E47 al promotor de *Alx3*. Amplificación del fragmento localizado en la posición -202 a +88 respecto al sitio de inicio de la transcripción de *Alx3* a partir de muestras de cromatina de células RC2.E10 inmunoprecipitadas (IP) con un anticuerpo anti-Twist (A) o anti-E47 (B). Nótase la ausencia de amplificación con IgG control.

Para determinar si Twist se une de forma directa a las cajas Eb1 o Eb2 llevamos a cabo EMSA con extractos nucleares de células RC2.E10. Estos ensayos mostraron la presencia de un complejo proteína-DNA tanto sobre Eb1 como sobre Eb2 (Figura 18). Las proteínas que forman estos complejos se unen a cada uno de estos elementos reguladores de manera específica, ya que desaparecieron al incluir en la reacción un oligonucleótido frío de secuencia similar a la de cada una de las sondas, pero no al incluir oligonucleótidos en las que cada una de las cajas E había sido mutada (Figura 18).

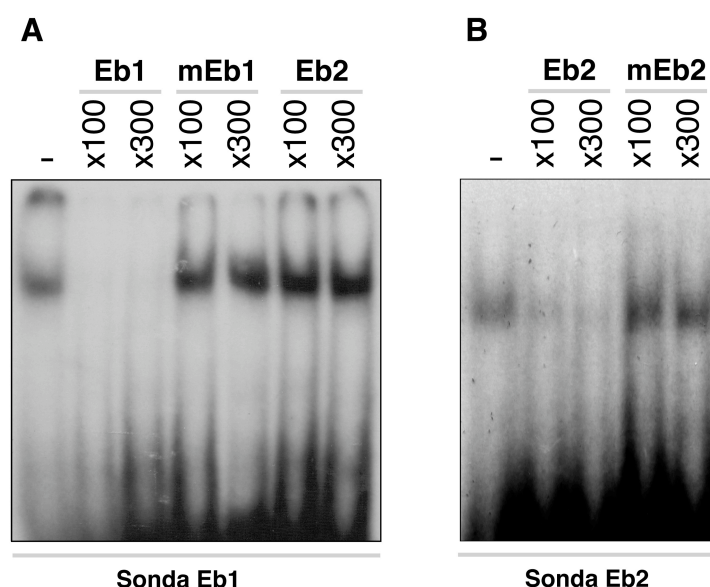


Figura 18: Ensayos de movilidad electroforética realizados con sondas correspondientes a las cajas Eb1 (A) y Eb2 (B). Los extractos nucleares de células RC2.E10 fueron incubados en ausencia (-) o presencia de los oligonucleótidos competidores indicados en la parte superior, que se usaron en un exceso de concentración 100 o 300 veces superior a la de la sonda. mEb1 y mEb2 corresponden a oligonucleótidos con mutaciones en las correspondientes cajas E.

Es importante resaltar que la adición de un exceso de oligonucleótido frío correspondiente a Eb2 a la reacción llevada a cabo con la sonda Eb1 no alteró la formación del complejo proteína-DNA, lo cual indica que los factores de transcripción que reconocen Eb1 son diferentes a los que reconocen Eb2 (Figura 18A).

La adición de un anticuerpo anti-Twist no alteró la formación del complejo unido a la Eb1, aunque en condiciones similares este anticuerpo produjo la disminución de la intensidad de un complejo unido a una sonda cuya secuencia corresponde a la de una caja E del promotor del gen Tinman (Eb3-Tinman), a la cual se une específicamente Twist (Laursen et al., 2007) (Figura 19A y B).

Por el contrario, la adición del anticuerpo anti-Twist a la reacción realizada en presencia de la sonda Eb2 produjo una inhibición en la formación de los complejos formados con extractos nucleares de células RC2.E10 o NIHT3T3, que expresan Twist

constitutivamente (Figura 19 C y D). Por tanto estos resultados indican que Twist es capaz de unirse específicamente a la caja Eb2 del promotor de *Alx3* pero no a la Eb1.

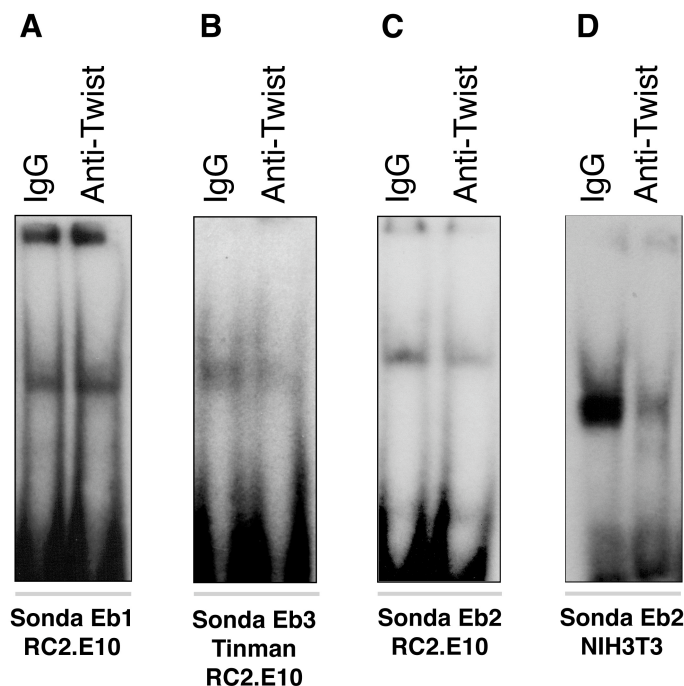


Figura 19: Unión de Twist a la caja Eb2 pero no a la Eb1. Ensayos de movilidad electroforética en gel realizados con las sondas y extractos nucleares indicados en la parte inferior. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de IgG control o de anticuerpo anti-Twist, como se indica en la parte superior.

Para investigar si Twist posee la capacidad de transactivar el promotor de *Alx3* a través de Eb2, cotransfectamos células RC2.E10 con un vector de expresión de *Twist* y con el plásmido *Alx202Luc*. Encontramos que Twist no produce incremento alguno en la actividad del promotor (Figura 20). La adición de un vector de expresión de *E47* tampoco produjo un incremento de la actividad (Figura 20).

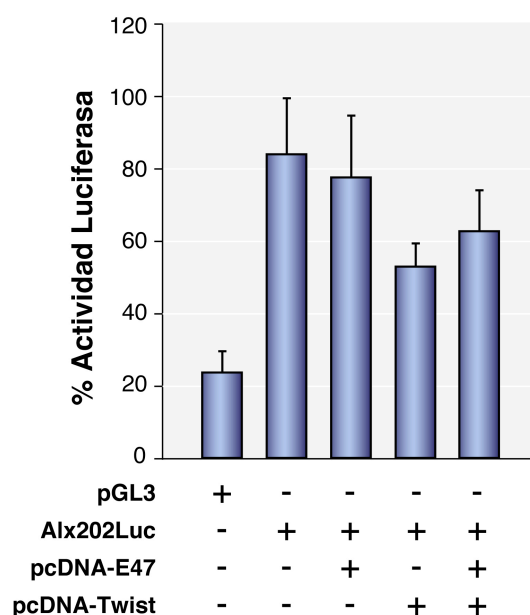


Figura 20: Twist no induce la activación del promotor de *Alx3* en células RC2.E10. Niveles de actividad luciferasa observados en las células RC2.E10 cotransfectadas con los plásmidos que se indican en la parte inferior.

Cabe interpretar este resultado como el reflejo de interferencias producidas por la existencia de niveles relativamente elevados de factores endógenos que puedan mediar la activación máxima de *Alx202Luc*. Para minimizar tales interferencias utilizamos células Hela en los siguientes experimentos, ya que esta línea celular no expresa niveles detectables de *Alx3* (Mirasierra y Vallejo, 2006). Así, la transfección de las células Hela con *Alx202Luc* produjo un leve aumento de la actividad luciferasa respecto al control pGL3 (Figura 21). Por otro lado, la cotransfección con el vector de expresión de Twist o el de E47, respectivamente, no produjo ningún incremento en la actividad. Por el contrario, la combinación de ambos produjo una clara inducción de la actividad del promotor (Figura 21). Estos resultados coinciden con estudios previos que indican que Twist coopera con E47 para regular la expresión de otros genes (Hamamori et al., 1997; Laursen et al., 2007). A continuación, comprobamos que tanto la mutación de la caja Eb1 como la de la Eb2 inhibe el efecto estimulador de Twist y E47 (Figura 21).

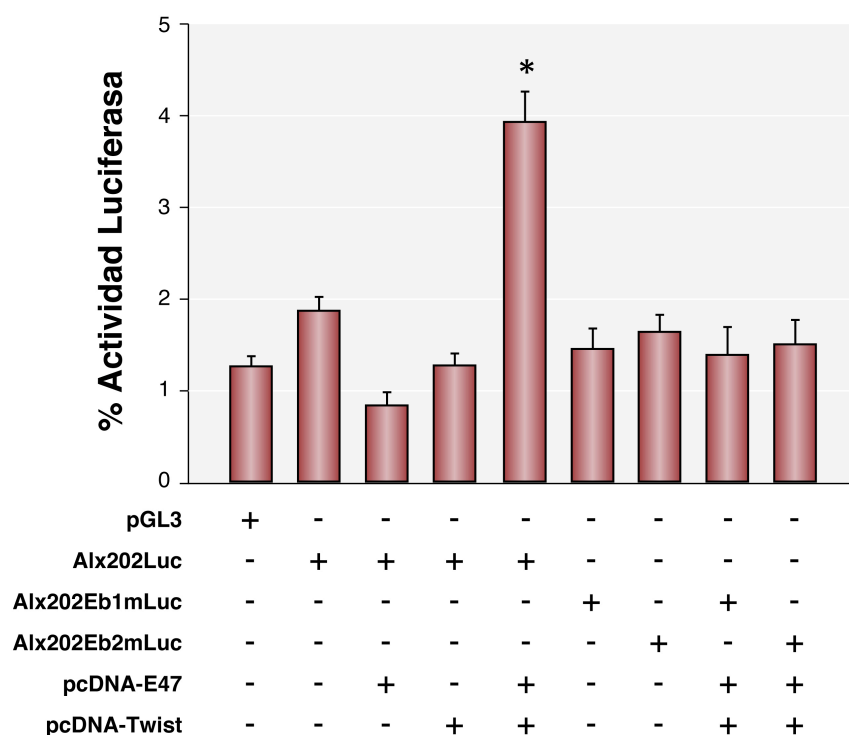


Figura 21: Twist induce la activación del promotor de *Alx3* en presencia de E47. Niveles de actividad luciferasa en células Hela cotransfectadas con los plásmidos indicados en la parte inferior. * $p < 0.05$ (Test de la t de Student).

Los resultados anteriores indican que la caja Eb1 es un elemento regulador importante para la actividad transcripcional de Twist y E47, aunque Twist sea incapaz de unirse a esta caja como quedó demostrado en los EMSA.

4.2.3. Regulación transcripcional de *Alx3* por USF1 y USF2.

Un análisis detallado de la secuencia de la caja Eb1 reveló que ésta coincide con la secuencia consenso óptima para la unión del factor de transcripción USF1 (Corre y Galibert, 2005). Por ello, decidimos estudiar la posible implicación de los factores de transcripción USF en la regulación de *Alx3*.

En primer lugar, mediante la realización de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina sobre células RC2.E10 demostramos que tanto USF1 como USF2 se unen al promotor de *Alx3* en la región que contiene las cajas E (Figura 22).

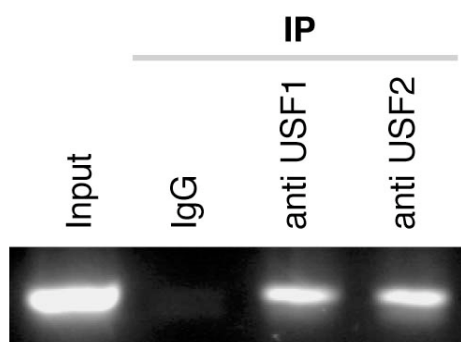


Figura 22: Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina que indican la unión USF1 y USF2 al promotor de *Alx3*. Se muestra la amplificación por PCR del fragmento localizado en la posición -202 a +88 respecto al sitio de inicio de la transcripción de *Alx3* a partir de

Para evaluar si USF1 y USF2 se unen directamente a la caja Eb1, llevamos a cabo EMSAs con extractos nucleares de células RC2.E10. En la figura 23A podemos observar que la adición de anticuerpos específicos contra ambas proteínas a los extractos incubados con la sonda Eb1 produce la desaparición de la banda correspondiente al complejo proteínico. Resultados similares se obtuvieron con extractos nucleares de las células Min6, línea celular que también expresa constitutivamente *Alx3* (Figura 23B). Sin embargo, cuando se utilizó la sonda Eb2 los complejos no se alteraron (Figura 23C). Esto indica que USF1 y USF2 se unen de forma directa a la caja Eb1 pero son incapaces de unirse específicamente la caja Eb2.

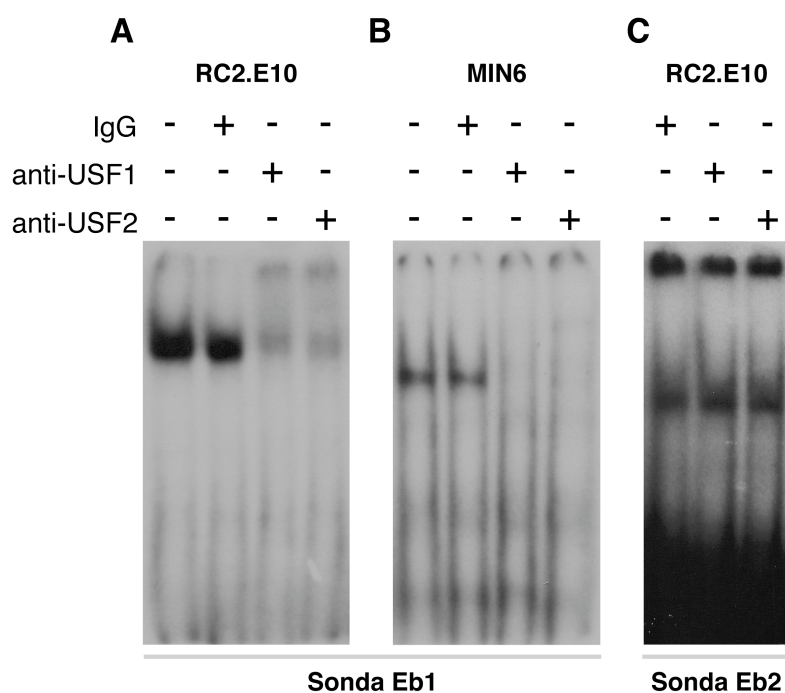


Figura 23: Unión de USF1 y USF2 a la caja Eb1. Ensayos de movilidad electroforética en los que los extractos nucleares de células RC2.E10 (A) o Min6 (B) se incubaron con la sonda Eb1 y con anti-USF1, anti-USF2 o IgG. C, Experimento similar a los anteriores, realizado con extractos nucleares de células RC2.E10 que se incubaron con la sonda Eb2.

Para investigar si los factores de transcripción USF poseen la capacidad de transactivar el promotor de *Alx3* a través de la caja Eb1, cotransfectamos las células RC2.E10 con vectores de expresión de USF1 y USF2 y el plásmido *Alx202Luc*. Encontramos que ni la expresión de USF1 ni la de USF2 produce incremento alguno en la actividad del promotor (Figura 24) al igual que habíamos observado en el caso de Twist. Este resultado se puede deber a la existencia de niveles relativamente elevados de USF endógeno. Para investigar esta posibilidad, cotransfectamos estas células con cantidades crecientes de un inhibidor dominante negativo de USF (DN-USF) (Figura 24).

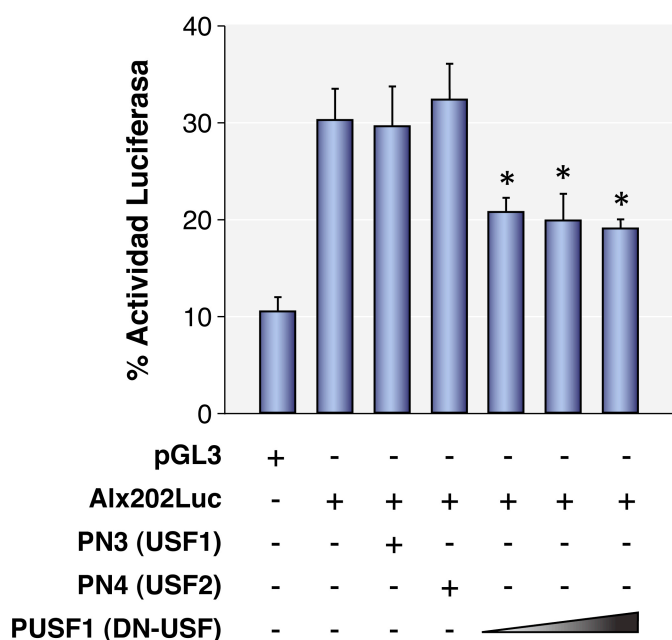


Figura 24: La expresión de un inhibidor dominante negativo de USF reprime la actividad del promotor de *Alx3*. Niveles de actividad luciferasa en células RC2.E10 cotransfectadas con *Alx202Luc* y con la combinación de PN3 (USF1) y PN4 (USF2) o 0.1, 0.2 y 0.5 μ g de P-USF1 (DN-USF), inhibidor dominante negativo para USF. * $p < 0.05$ en relación con la actividad generada por *Alx202Luc* (Test de la t de Student).

Como podemos observar en la Figura 24, la presencia de este inhibidor dominante negativo tuvo como consecuencia una disminución parcial pero significativa de la actividad luciferasa generada por Alx202Luc, lo cual indica que los factores USF participan directamente en la transactivación del promotor proximal de *Alx3* junto con otros factores de transcripción en células RC2.E10.

Para minimizar las interferencias que posiblemente puedan ocasionar los niveles relativamente elevados de USF1 y USF2 en las células RC2.E10 utilizamos células Hela en los siguientes experimentos. La cotransfección de las células Hela con Alx202Luc y los vectores de expresión de USF1 y USF2 indicó que estos factores producen un incremento en la actividad luciferasa generada por el promotor de *Alx3*. La adición de E47 y/o Twist no aumentó la actividad transcripcional generada por los factores USF (Figura 25), lo cual indica que la actividad ejercida a través de la caja Eb1 es independiente de la ejercida a través de la caja Eb2.

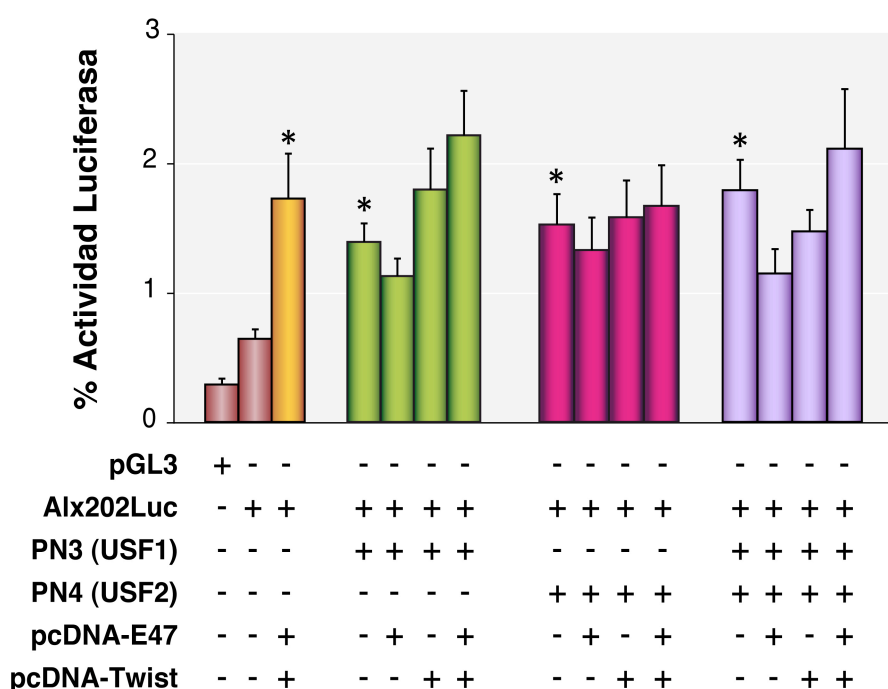


Figura 25: Los factores de transcripción USF1 y USF2 inducen la activación del promotor de *Alx3*. Niveles de actividad luciferasa en células Hela cotransfectadas con Alx202Luc y con los plásmidos indicados en la parte inferior. * $p < 0.05$ con respecto a la actividad generada por Alx202Luc (Test de la t de Student).

Además, observamos que la inducción de la actividad luciferasa de Alx202Luc generada por USF1 o USF2 se inhibe cuando la caja Eb1 se encuentra mutada, pero no se altera cuando se encuentra mutada la caja Eb2 (Figura 26). Inesperadamente, la

mutación de la caja Eb2 tuvo como consecuencia la generación de un efecto sinérgico entre USF1 y USF2 cuando estos se expresan concomitantemente.

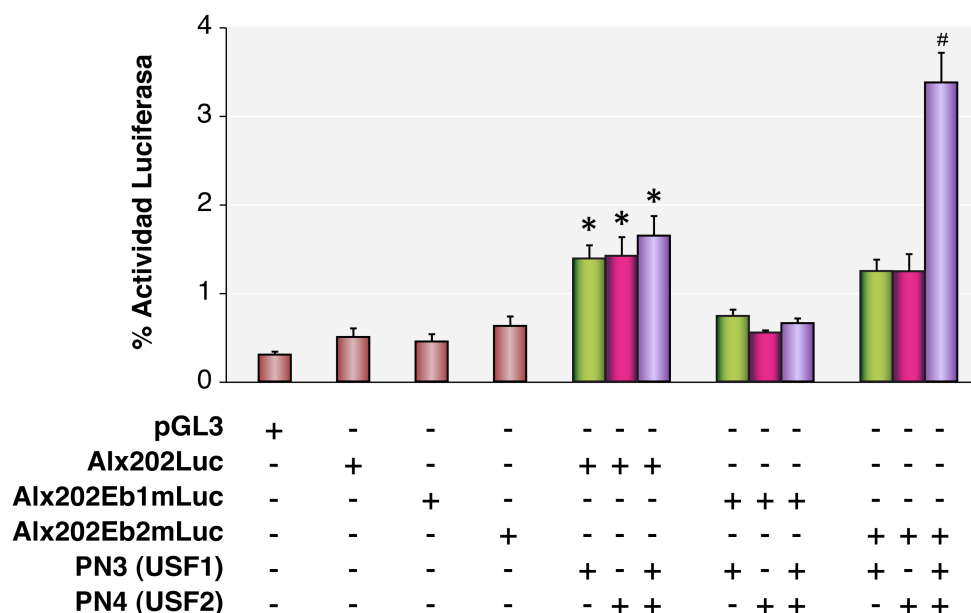


Figura 26: La actividad transcripcional de USF1 y USF2 depende de la integridad de la caja Eb1. Niveles de actividad luciferasa mostrados por células Hela cotransfectadas con Alx202Luc y con los plásmidos indicados en la parte inferior. * $p < 0.05$ con respecto a la actividad generada por ALx202Luc; # $p < 0.05$ con respecto a la actividad generada por Alx202Luc cotransfectado con PN3 y PN4 (Test de la t de Student).

Todo lo anterior sugiere que para que Twist y E47 puedan ejercer su actividad transactivadora a través de su unión a la caja Eb2, se requiere la presencia de USF1 y USF2 unidos a la caja Eb1. Para evaluar esta hipótesis, investigamos el posible efecto del dominante negativo de USF sobre la transactivación del promotor de *Alx3* inducida por Twist y E47. Como podemos observar en la Figura 27, la presencia del inhibidor dominante negativo en las células Hela inhibe la actividad transcripcional de Alx202Luc estimulada por Twist y E47, demostrando que los factores USF son necesarios para la activación del promotor de *Alx3* por Twist y E47. Como cabía esperar, la adición del inhibidor dominante negativo produjo también la disminución de la actividad luciferasa inducida por USF1 y USF2.

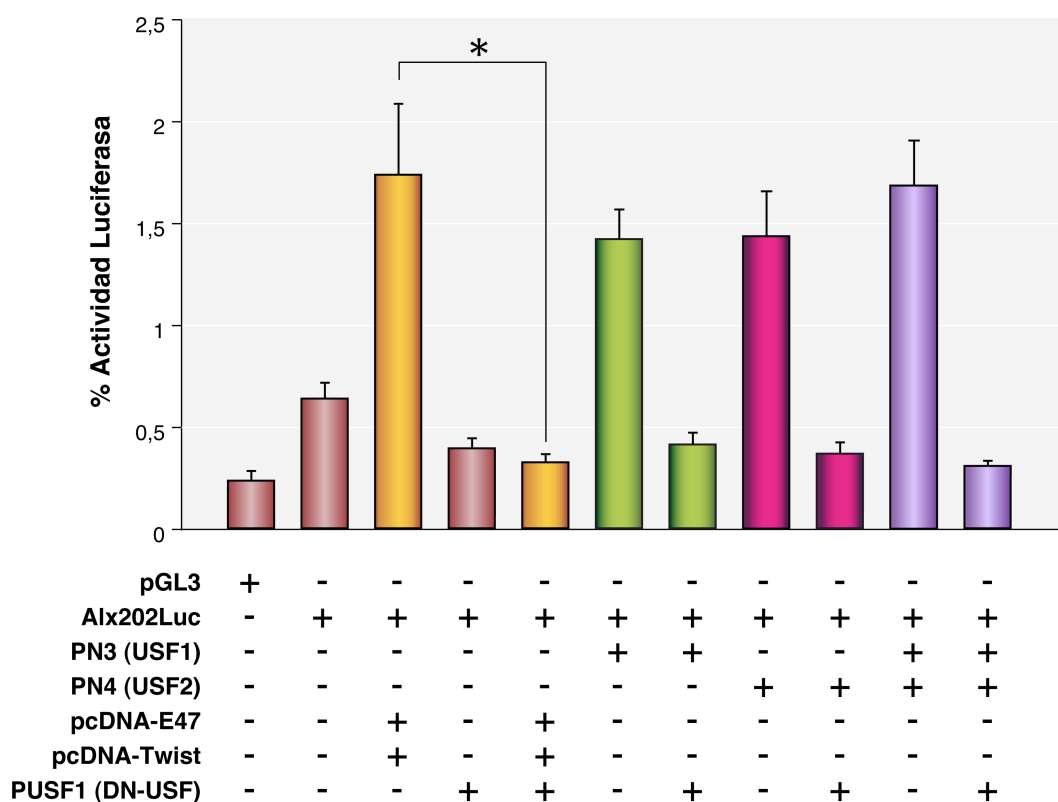


Figura 27: Los USF son necesarios para la activación del promotor de *Alx3* por Twist y E47. Niveles de actividad luciferasa en células Hela cotransfectadas con Alx202Luc y con los plásmidos que se indican en la parte inferior. * $p < 0.05$ (Test de la t de Student).

4.3. *Alx3* y embriopatía diabética.

4.3.1. La carencia de *Alx3* no empeora la tolerancia a la glucosa durante la gestación.

Una de las consecuencias de la deficiencia de *Alx3* es la alteración de la homeostasis de la glucosa, que se manifiesta con hiperglucemia moderada, disminución de la tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (Mirasierra et al., 2011). Por ello, quisimos investigar si esta situación podría empeorar al iniciarse la gestación y, en qué medida estas alteraciones podrían contribuir a la aparición de los defectos del cierre del tubo neural observados anteriormente (Lakhwani et al., 2010). Para evaluar esta posibilidad, realizamos un test de tolerancia a glucosa en hembras de ratón *Alx3*^{+/+} o *Alx3*^{-/-}, que se realizó antes de la gestación y transcurridos 8.5 días

de ésta. Como se muestra en la Figura 28, las hembras $Alx3^{-/-}$ no gestantes presentan intolerancia a la glucosa que se manifiesta por niveles de glucemia elevados con respecto a los niveles observados en las hembras $Alx3^{+/+}$. Por otro lado, se observó que la gestación no empeora la severidad de esta intolerancia en las hembras $Alx3^{-/-}$, mientras que en las hembras $Alx3^{+/+}$ desencadenó una ligera intolerancia similar a la observada en las hembras $Alx3^{-/-}$. Por tanto, estos datos indican que la ligera hiperglucemia de las hembras gestantes $Alx3^{-/-}$ no puede ser responsable de los defectos del cierre del tubo neural.

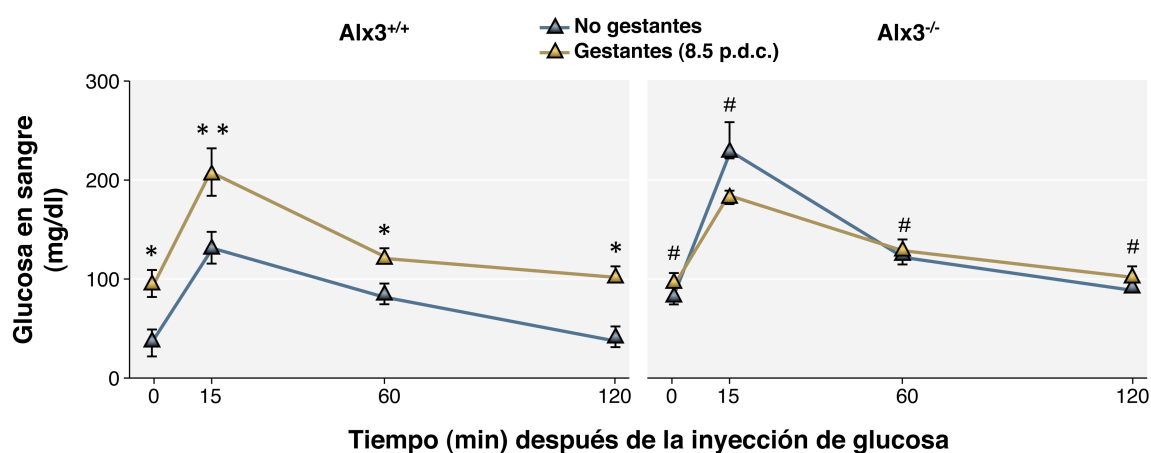


Figura 28: Test de tolerancia a la glucosa en hembras gestantes y no gestantes. Se llevaron a cabo en hembras $Alx3^{+/+}$ o $Alx3^{-/-}$ antes de la gestación y transcurridos 8.5 días de ésta en ambos casos. En cada grupo se usaron 15 animales. d.p.c.: días postcoito. *p<0.05, **p<0.01, #p<0.05 en comparación con hembras $Alx3^{+/+}$ no gestantes (Test de ANOVA de dos vías seguido de corrección de Bonferroni).

4.3.2. Malformaciones inducidas por la hiperglucemia en embriones $Alx3^{-/-}$.

Teniendo en cuenta que la ausencia de $Alx3$ produce alteraciones relativamente leves en la homeostasis de la glucosa en ratones adultos y defectos del cierre del tubo neural con penetrancia parcial durante el desarrollo embrionario, nos propusimos investigar si el déficit de $Alx3$ puede aumentar la incidencia o la severidad de estas malformaciones congénitas en condiciones de hiperglucemia severa. Esta posibilidad fue investigada en un modelo de diabetes gestacional en ratón inducido por estreptozotocina, como se describe en detalle en la sección de Material y Métodos.

Como se muestra en la Figura 29, la diabetes materna no produjo malformaciones congénitas en los embriones *Alx3*^{+/+}. Por el contrario, en un 12-14 % de los embriones *Alx3*^{-/-} se detectaron malformaciones congénitas sorprendentemente más severas que los defectos del cierre del tubo neural observados previamente, por lo que la carencia en *Alx3* parece aumentar la susceptibilidad de los embriones a la hiperglucemia.

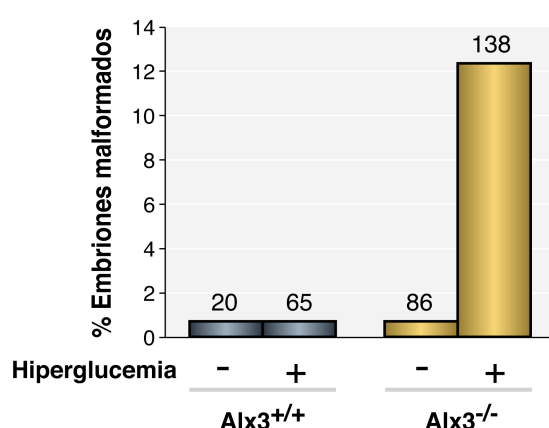


Figura 29: Porcentaje de embriones con malformaciones severas detectados a los 10.5 días de gestación en condiciones de hiperglucemia. Los números en la parte superior de las barras indican el número total de embriones examinados en cada condición.

Las malformaciones observadas son de diferentes tipos. En primer lugar, algunos embriones presentaban defectos generalizados del desarrollo que se manifiestan por alteraciones morfológicas extremadamente severas y detención del desarrollo en estadios tempranos (Figura 30B y C). En otros, la organización general del embrión está preservada, pero se pueden apreciar defectos regionales en el programa de desarrollo que afectan a diferentes estructuras, tales como el corazón, los órganos abdominales, los arcos branquiales y la región craneofacial (Figura 30D). También, encontramos embriones deficientes en *Alx3* con defectos localizados que afectan al cierre del tubo neural (Figura 30E). Otros embriones presentaban alteraciones morfológicas generalizadas incluyendo defectos del cierre del tubo neural (Figura 30F). Además, en algunos embriones carentes de *Alx3* con morfología aparentemente normal, se detectaron hemorragias o alteraciones de la vascularización en la región craneofacial (Figura 30G). Finalmente, en algunos de estos embriones, motorizamos el patrón anormal de los dominios de expresión de *Alx3* mediante tinción con β -galactosidasa (Figura 30H).

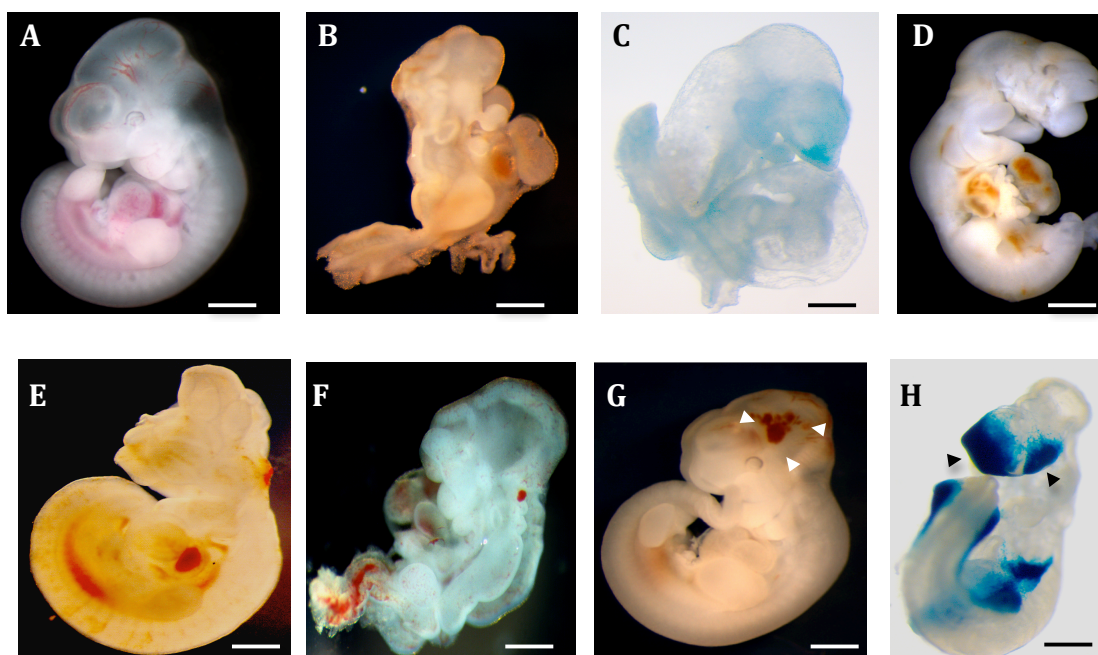


Figura 30: Malformaciones severas inducidas por hiperglucemia gestacional asociadas a la deficiencia de *Alx3*. A, Ejemplo representativo de un embrión de E10.5 procedente de una hembra no diabética. B, C, D, E y F, Ejemplos de malformaciones severas en embriones *Alx3*^{-/-} del mismo estadio procedentes de hembras gestantes diabéticas. Las puntas de flecha blancas en G señalan alteraciones vasculares. H, Embrión con patrón de expresión de asimétrico de *lacZ* en el mesénquima craneofacial. Las puntas de flecha negras señalan la asimetría. Las barras de escala representan 1 mm (A y E-H), 250 μ m (B y C) o 1.5 mm (D).

4.3.3. La deficiencia de *Alx3* limita el incremento de la expresión de enzimas y factores de transcripción que protegen frente al estrés oxidativo.

Se sabe que la hiperglucemia conduce a un incremento del estrés oxidativo, el cual da lugar a la producción en exceso de especies reactivas de oxígeno. Se ha propuesto que durante el embarazo diabético, este exceso de especies reactivas de oxígeno podría estar directamente relacionado con la aparición de malformaciones congénitas que caracterizan a la embriopatía diabética. Por esta razón decidimos investigar la expresión de genes que codifican enzimas que están implicadas en los mecanismos que protegen a las células frente al estrés oxidativo.

Mediante RT-PCR cuantitativa encontramos que en los embriones *Alx3*^{+/+}, la hiperglucemia induce un incremento en la expresión de la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), de la catalasa y de la glutatión peroxidasa (Gpx-1) y una reducción en la expresión de la óxido nítrico sintetasa (NOS). Por el contrario, la deficiencia de *Alx3* impidió la inducción de la expresión de los genes que codifican las

tres primeras enzimas, mientras que la expresión de la óxido nítrico sintetasa permaneció reducida (Figura 31A). En el caso de genes que codifican factores de transcripción importantes para la regulación del estrés oxidativo como *FoxO1* y *FoxO4* (Forkhead Homeobox type O), observamos también un aumento de su expresión inducido por hiperglucemia que se mostró inhibido en embriones deficientes de *Alx3* (Figura 31B).

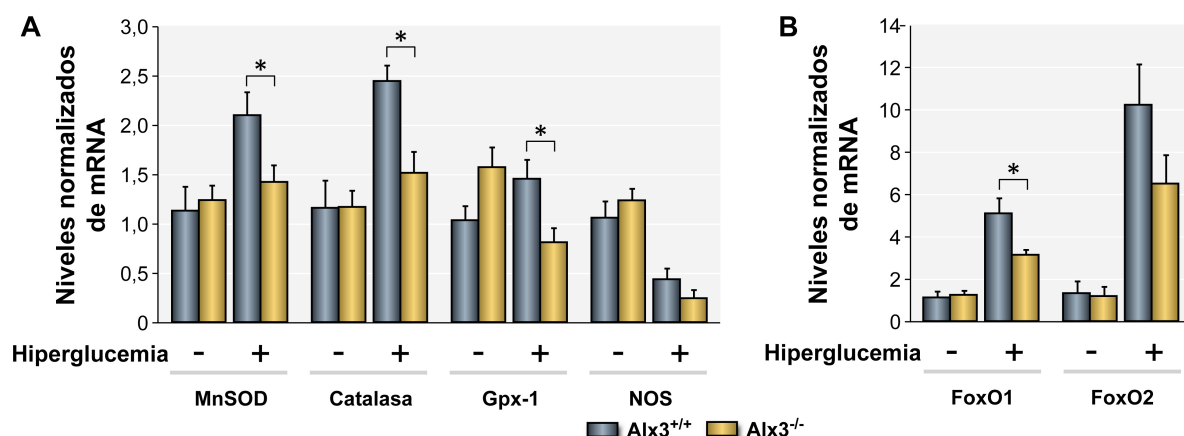


Figura 31: RT-PCR cuantitativa. Niveles relativos de mRNA de MnSOD, Gpx-1, Catalasa y NOS (A) y de FoxO1 y FoxO2 (B) en embriones control y *Alx3*^{-/-} de E10.5 sometidos o no a hiperglucemia durante la gestación. Para cada condición se usaron 7 embriones. *p<0.05 (Test de la t de Student).

Por lo tanto, existe una aparente correlación entre la aparición de malformaciones embrionarias inducidas por la hiperglucemia y los niveles relativos de expresión de las enzimas que protegen frente al estrés oxidativo en los embriones deficientes de *Alx3*.

4.3.4. *Alx3* es necesario para la expresión de genes que regulan el desarrollo embrionario durante la hiperglucemia gestacional.

En relación con reguladores transcripcionales importantes para el desarrollo embrionario, observamos que la hiperglucemia produjo una reducción en la expresión del factor de transcripción AP2 que se vio acentuada en ausencia de *Alx3* (Figura 32A). Sin embargo, la hiperglucemia sí dio lugar a un aumento de la expresión de *Cited2* que se mostró inhibido en embriones deficientes de *Alx3* (Figura 32B). Por el contrario, la hiperglucemia no produjo ninguna diferencia en los niveles de expresión de *Pax3*. Además, observamos que la hiperglucemia redujo los niveles de expresión de p53 tanto en los embriones *Alx3*^{+/+} como en los *Alx3*^{-/-} (Figura 32B).

Por otro lado, encontramos que la hiperglucemia aumentó la expresión de genes que codifican factores de señalización extracelular importantes para el desarrollo embrionario como BMP4 (Bone Morphogenetic Protein) y PDGFR α (Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas). Sin embargo en embriones deficientes de *Alx3* se produjo una inhibición de este aumento.(Figura 32B). Por otro lado, observamos que la hiperglucemia produjo la reducción de la expresión del receptor de folato, *Folbp1* (también llamado *Folr1*) sólo en los embriones *Alx3*^{-/-} procedentes de madres diabéticas (Figura 32B).

También, estudiamos la expresión de algunos genes que codifican enzimas que están implicadas en mecanismos epigenéticos de regulación de la expresión génica como modificación de histonas y metilación del DNA. Centraremos nuestra atención en la expresión de la histona acetiltransferasa *Gcn5*, puesto que su carencia está asociada a la aparición de defectos del cierre del tubo neural (Lin et al., 2008) y en la de la DNA metiltransferasa DNMT3a (Ghoshal et al., 2006; Ichi et al., 2010). Encontramos que la hiperglucemia produjo un descenso significativo en la expresión de DNMT3a que se acentuó aún más en ausencia de *Alx3*. No se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de *Gcn5* (Figura 32C).

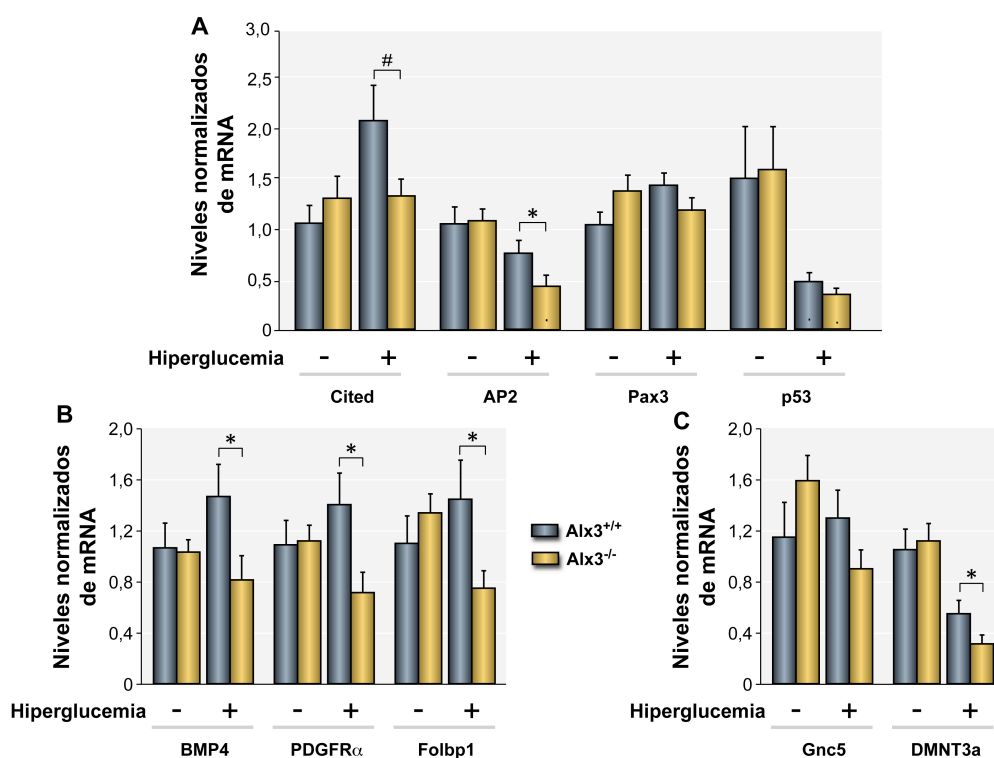


Figura 32: RT-PCR cuantitativa. Niveles relativos de mRNA de *Cited2*, *AP2*, *Pax3*, y *p53* (A), de *BMP4*, *PDGFR α* y *Folbp1* (B), y de *Gcn5* y *DNMT3a* (C) en embriones control y *Alx3*^{-/-} de 10.5 días de gestación sometidos o no a hiperglucemia durante la gestación. Para cada condición se usaron 7 embriones. *p<0.05; #p=0.06 (Test de la t de Student).

Finalmente, como habíamos detectado alteraciones vasculares en algunos embriones *Alx3*^{-/-}, estudiamos la expresión de genes implicados en la regulación de la vascularización. Encontramos que la hiperglucemia induce la expresión de *Hif1α* en los embriones *Alx3*^{+/+}, pero este efecto está reducido en los embriones deficientes en *Alx3* (Figura 33).

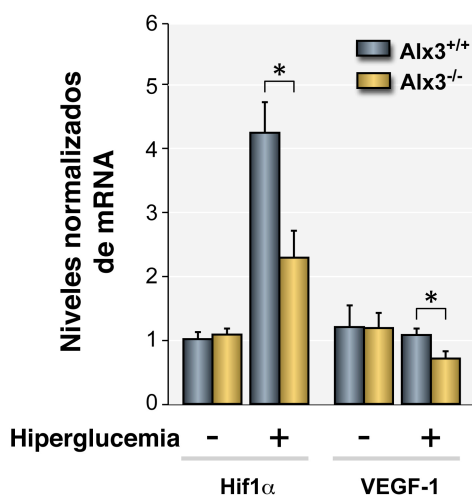


Figura 33: RT-PCR cuantitativa. Niveles relativos de mRNA de *Hif1α* y *VEGF-1* en embriones control y *Alx3*^{-/-} de 10.5 días de gestación sometidos o no a hiperglucemia durante la gestación. Para cada condición se usaron 7 embriones. **p*<0.05 (Test de la t de Student).

Además en estos embriones, observamos una reducción en la expresión de *VEGF-1* (Figura 33), un gen diana regulado por *Hif1α*.

4.3.5. La expresión de *Alx3* es necesaria para el efecto protector del ácido fólico en la embriopatía diabética.

Puesto que la expresión de *Alx3* depende de la presencia del ácido fólico, decidimos investigar si la administración de ácido fólico durante la gestación reduce la incidencia de malformaciones severas asociadas a un déficit de *Alx3* en condiciones de hiperglucemia. Para ello utilizamos embriones heterocigotos *Alx3*^{+/-} procedentes de gestantes hiperglucémicas.

En primer lugar, encontramos que estos embriones procedentes de gestantes hiperglucémicas también presentan malformaciones severas pero en menor proporción que los embriones *Alx3*^{-/-} (Figura 34), lo cual refleja la haploinsuficiencia de *Alx3*. La incidencia de estas malformaciones en los embriones heterocigotos se redujo significativamente mediante el tratamiento de las hembras gestantes con ácido fólico. Por el contrario, este tratamiento no tuvo un efecto significativo en la incidencia de malformaciones observadas en los embriones homocigotos deficientes en *Alx3*.

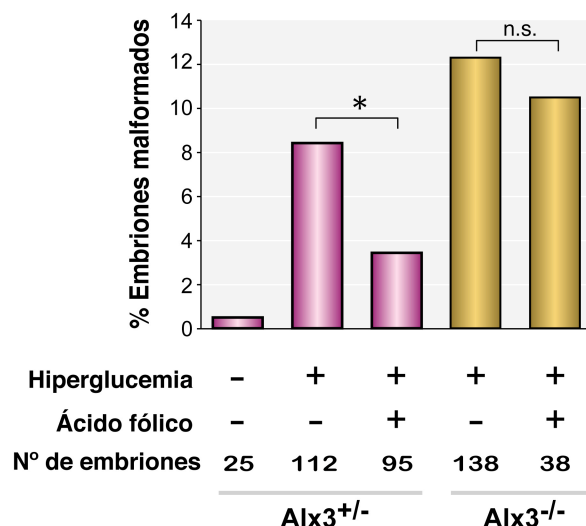


Figura 34: El ácido fólico disminuye la incidencia de malformaciones inducidas por hiperglucemia. Porcentaje de embriones con malformaciones severas detectados a los 10.5 días de gestación en condiciones de hiperglucemia. Los números en la parte inferior de las barras indican el número total de embriones examinados en cada condición. * $p < 0.005$ (Test de χ^2), n.s.: no significativo.

Estos resultados, nos llevaron a determinar si la administración de ácido fólico durante la gestación es capaz de disminuir la caída de la expresión de aquellos genes afectados por la carencia de *Alx3* en condiciones de hiperglucemia.

En primer lugar, observamos que en los embriones *Alx3*^{+/-} el ácido fólico no produjo ningún cambio en la expresión de los genes que codifican enzimas que protegen frente al estrés oxidativo (Figura 35).

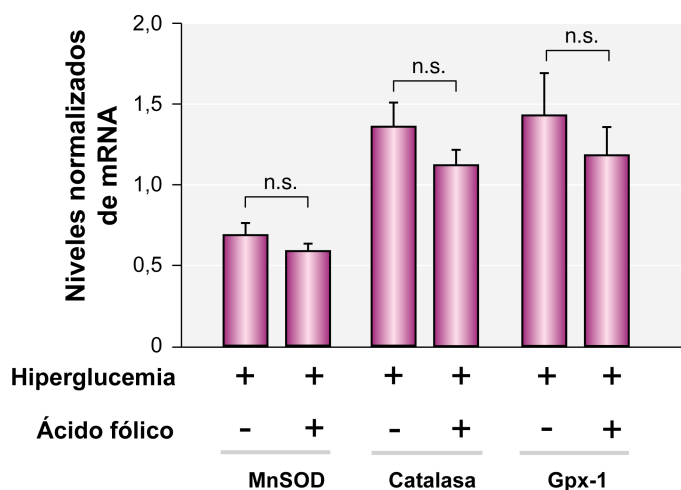


Figura 35: RT-PCR cuantitativa. Niveles relativos de mRNA de MnSOD, Catalasa y Gpx-1 en embriones *Alx3*^{+/-} de 10.5 días de gestación desarrollados en hiperglucemia procedentes de gestantes tratadas o no con ácido fólico. Para cada condición se usaron 7 embriones. Los datos fueron analizados mediante un test de la t de Student. n.s.: no significativo.

Por el contrario, en estos embriones la administración de ácido fólico produjo un ligero pero significativo aumento en la expresión de *BMP4* y *AP2* (Figura 36A). También observamos que el tratamiento con ácido fólico aumentó la expresión de DNMT3a, pero no la de Folbp1 (Figura 36B).

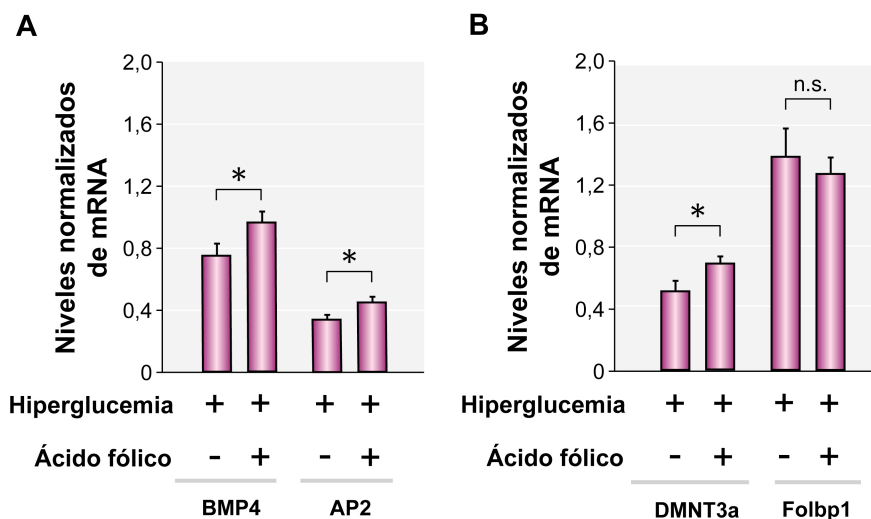


Figura 36: RT-PCR cuantitativa. Niveles relativos de mRNA de *BMP4* y *AP2* (A) y de *DNMT3a* y *Folbp1* (B) en embriones *Alx3*^{+/-} de 10.5 días de gestación desarrollados en hiperglucemia procedentes de gestantes tratadas o no con ácido fólico. Para cada condición se usaron 7 embriones. **p*<0.05; n.s.: no significativo (Test de la *t* de Student).

Por último, como podemos observar en la Figura 37 el ácido fólico aumentó ligeramente la expresión de *Hif1α* en embriones heterocigotos sometidos a hiperglucemia.

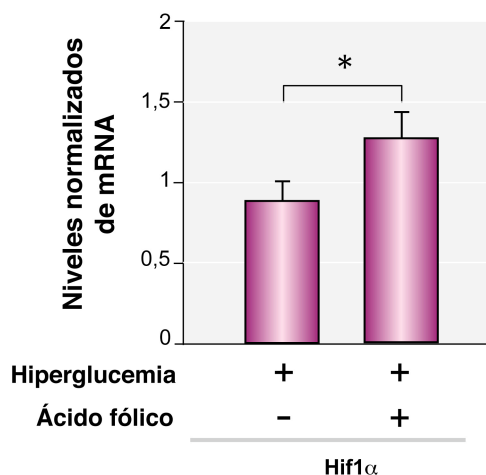


Figura 37: RT-PCR cuantitativa. Niveles relativos de mRNA de *Hif1α* en embriones *Alx3*^{+/-} de 10.5 días de gestación desarrollados en hiperglucemia procedentes de gestantes tratadas o no con ácido fólico. Para cada condición se usaron 7 embriones. **p*<0.05 (Test de la *t* de Student).

Discusión



5. DISCUSIÓN.

5.1. La expresión de *Alx3* depende de la disponibilidad de ácido fólico *in vivo*.

Como comentamos en la introducción, se desconoce el mecanismo por el cual la administración suplementaria de ácido fólico durante el periodo periconcepcional disminuye la incidencia de defectos congénitos del cierre del tubo neural (Eichholzer et al., 2006). Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio utilizando embriones de ratón cultivados *ex utero* pusieron de manifiesto que la expresión de *Alx3* depende de la presencia de ácido fólico *in vitro* (Lakhwani et al., 2010). Ello sugiere que la regulación de éste u otros genes importantes para el desarrollo embrionario constituye un posible mecanismo de acción del ácido fólico. Los resultados obtenidos en esta tesis apoyan esta idea, ya que nos han permitido demostrar que la expresión de *Alx3* es dependiente de la disponibilidad del ácido fólico *in vivo*. Por tanto, *Alx3* constituye la primera diana no metabólica a través de la cual el ácido fólico ejerce su papel preventivo sobre la incidencia de los defectos del cierre del tubo neural.

Sin embargo, en estos estudios *in vivo*, encontramos que la detección de estos defectos es difícil en embriones procedentes de hembras alimentadas con una dieta deficiente en ácido fólico debido al marcado descenso en el éxito reproductor de éstas. Estos datos están en concordancia con los de otras investigaciones (Burgoon et al., 2002; Burren et al., 2008) en las cuales también se destaca que los bajos niveles de ácido fólico que reciben los embriones podrían interferir con la implantación o dar lugar a reabsorciones embrionarias, impidiendo de esta forma llevar a cabo un análisis de los efectos que la deficiencia de ácido fólico podría tener durante la formación del tubo neural.

Por otro lado, *Alx3* se expresa en el alantoides (ten Berge et al., 1998), una estructura crítica para el desarrollo embrionario temprano (Inman y Downs, 2007). Por tanto, si la expresión de *Alx3* está disminuida en esta estructura como consecuencia de la disminución del aporte de ácido fólico, el desarrollo puede verse comprometido antes de que tenga lugar el cierre del tubo neural. Esta situación de elevada susceptibilidad de los embriones *Alx3*^{-/-} en los primeros estadios del desarrollo debida a una disponibilidad limitada del ácido fólico podría explicar el elevado número de embriones con retraso severo en el desarrollo y el incremento de

reabsorciones embrionarias en comparación con los embriones *Alx3^{+/+}*.

5.2. *Alx3* es necesario para la supervivencia celular durante el desarrollo de la región craneofacial.

La apoptosis excesiva que posiblemente contribuye a que exista una menor densidad celular en la región anterior de la cabeza de los embriones *Alx3^{-/-}* sugiere que el fallo del cierre del tubo neural pueda estar relacionado con un defecto en el desarrollo del mesénquima craneofacial. La expansión del mesénquima contribuye a la elevación y aposición de los pliegues neurales de manera específica en la región craneal (Gordon, 1985). Existen genes cuya inactivación conduce a la aparición de defectos del cierre del tubo neural debidos a defectos en esta región, como es el caso de *Hctd1* (Zohn et al., 2007), *AP2* (Schorle et al., 1996), *Twist* (Chen y Behringer, 1995; Soo et al., 2002), y *Cart1* (Zhao et al., 1996; Qu et al., 1999). *Alx3* se expresa mayoritariamente en el mesénquima de la región anterior de la cabeza en un estadio crítico para el cierre del tubo neural que además coincide con la expresión de *Cart1* y *Twist* (Zhao et al., 1996; ten Berge et al., 1998; Beverdam et al., 2001). Los embriones *Alx3^{-/-}* presentan un fenotipo muy similar al observado en los embriones carentes de *Cart1* o *Twist*, en los cuales los defectos del cierre del tubo neural se asocian con un defecto en la expansión del mesénquima de la región anterior de la cabeza debido a una elevada muerte celular. Esto provoca una seria disminución en el número de células mesenquimales en esta región, afectando a la elevación de los pliegues neurales a nivel craneal (Chen y Behringer, 1995; Zhao et al., 1996). Por lo tanto, es posible que *Alx3* participe en el cierre del tubo neural mediante un mecanismo similar. Por otro lado, la carencia de *Alx3* no altera el patrón de expresión de estos genes, lo cual sugiere que los defectos del cierre del tubo neural debidos a la ausencia de *Alx3* no se deben a alteraciones en *Cart1* o *Twist*.

Aunque los mecanismos por lo cuales se produce un fallo en el cierre del tubo neural no se conocen completamente, estas observaciones indican que todas estas proteínas desempeñan funciones a nivel del mesénquima craneofacial, y su deficiencia contribuye a la alteración de las células de esta región causando en última instancia defectos del cierre del tubo neural.

Es interesante destacar que la deficiencia de *Twist* produce una disminución en

la expresión de *Alx3*, *Alx4* y *Cart1*, lo cual conduce a pensar que estos genes puedan estar bajo el control de *Twist*. Por lo tanto, es posible que la pérdida de la función de estos genes de la familia *aristaleless* pueda contribuir al fenotipo observado en los embriones deficientes en *Twist* (Verzi et al., 2002).

Por todo esto, podemos concluir que *Alx3* es necesario para la supervivencia celular durante el desarrollo de la región craneofacial, así como para el cierre del tubo neural.

5.3. Regulación de la expresión de *Alx3* por ácido fólico.

Los mecanismos por los cuales el ácido fólico regula la expresión de *Alx3* aún no se han determinado. Aunque la existencia de un mecanismo transcripcional que implique la unión de un factor de transcripción a un elemento regulador de respuesta a ácido fólico no puede descartarse, no hemos podido encontrar ninguna evidencia sobre la existencia de este elemento en el análisis de regiones conservadas localizadas en un fragmento relativamente grande (~18 kb) del promotor y en el primer intrón.

No obstante, es importante tener en cuenta que las células RC2.E10 usadas en todos estos estudios de transfección son de origen neural y no mesenquimal. Por lo tanto, es posible que la función de transactivación a través de un elemento de respuesta a ácido fólico requiera un contexto genómico apropiado en cuanto a conformación de la cromatina, propio de células mesenquimales. Son necesarias futuras investigaciones para esclarecer si el ácido fólico estimula la expresión de *Alx3* en los diferentes tipos de células en los que se expresa este gen.

Otra posibilidad es que el ácido fólico regule la expresión de *Alx3* mediante procesos de remodelación de la cromatina. El mantenimiento, establecimiento y modificación de la organización global de la cromatina, así como su estructura local, están modulados por un gran número de proteínas que generan dominios de cromatina, activos o no para la transcripción en respuesta a un estímulo ambiental (Jones y Kadonaga, 2000; Wolffe y Hansen, 2001). El ácido fólico podría regular la transcripción de *Alx3* de forma indirecta, modificando su grado de metilación. Se sabe que en humanos, el gen *ALX3* se encuentra hipermetilado en neuroblastomas (Wimmer et al., 2002). La implicación del ácido fólico en los procesos que regulan la transferencia de los grupos metilo está bien establecida. Normalmente la

hipometilación génica está asociada a niveles bajos de folatos, aunque también se puede producir hipermetilación debido a un aumento compensatorio de la expresión de las DNA-metiltransferasas en estas condiciones (Ghoshal et al., 2006). Por otro lado, la remodelación de la cromatina incluye modificaciones covalentes postraduccionales como hiperacetilación, desacetilación o metilación de histonas. Las DNA-metiltransferasas pueden alterar la actividad de las metiltransferasas de histonas (Fuks et al., 2003). Por lo tanto, variaciones en los niveles de ácido fólico podrían alterar la metilación de *Alx3* y como consecuencia su regulación a través de mecanismos complejos aún por determinar.

Otro mecanismo que puede alterar la expresión génica es la regulación de la estabilidad del mRNA. Existen casos en los que ciertas hormonas regulan la estabilidad del mRNA y por lo tanto regulan la expresión génica a nivel postranscripcional (Staton et al., 2000; Menon et al., 2004). La estabilidad del mRNA está regulada por interacciones complejas en las que participan diferentes proteínas de unión al RNA a través de secuencias específicas localizadas en la región 3' UTR de muchos mRNA (Jing et al., 2005). EL mRNA de *Alx3* contiene una posible señal de inestabilidad en su región 3' UTR (Perez-Villamil et al., 2004), por lo que, cabe también la posibilidad de que el ácido fólico pueda regular su expresión modulando la estabilidad del mRNA.

5.4. Twist, USF1 y USF2 cooperan en la regulación transcripcional de *Alx3*.

El análisis comparativo de un segmento de aproximadamente 18 kb del promotor de *Alx3*, reveló la existencia de regiones cuyas secuencias presentan una elevada similitud en diferentes especies de mamíferos. Este nivel de conservación releja probablemente su importancia funcional en la regulación de *Alx3*. En la región proximal del promotor encontramos evidencias sobre la existencia de elementos reguladores tanto activadores como represores. Estas regiones constituyen posibles dianas de diferentes factores de transcripción.

En primer lugar, consideramos Twist como un posible candidato ya que, en el ratón, se ha demostrado que la expresión de *Alx3* está disminuida en los primordios de las extremidades y en el mesénquima de la región anterior de la cabeza de embriones carentes de *Twist* (Loebel et al., 2002; Soo et al., 2002; Bildsoe et al., 2009).

Por otro lado, los embriones *Alx3*^{-/-} presentan defectos del cierre del tubo neural al igual que los embriones que tienen inactivado *Twist*, lo cual sugiere que estos genes están relacionados funcionalmente. Además, el promotor de *Alx3* contiene cajas E que constituyen sitios potenciales de unión de *Twist* (Loebel et al., 2002).

En esta tesis, se demuestra que *Twist* estimula la actividad del promotor de *Alx3* a través de su unión a la caja Eb2 situada entre los nucleótidos -127 y -122 respecto al sitio de inicio de la transcripción. El factor de transcripción *Twist* probablemente actúe formando parte de un complejo heterodimérico, ya que sólo induce la actividad transcripcional de *Alx3* en presencia de la proteína E47. Se sabe que *Twist* puede formar heterodímeros con E47 (Spicer et al., 1996; Hamamori et al., 1997; Verzi et al., 2002). Por tanto, *Twist* parece funcionar de manera similar a la de otros factores bHLH de clase II que forman heterodímeros con proteínas E y juegan un papel específico en el desarrollo del sistema nervioso (Flora et al., 2007).

El factor E47 es uno de los dos productos del gen *E2A* (*TCF3*) (Murre et al., 1989; Watada et al., 1995) y puede actuar como regulador transcripcional positivo o negativo. Se ha visto que cuando funciona como activador (como en el caso de genes miogénicos), requiere la interacción con co-activadores con actividad acetilasa de histonas (HAT), como CBP/p300 y PCAF (Qiu et al., 1998; Bradney et al., 2003). Serán necesarios más estudios para determinar con mayor precisión con qué coactivadores interactúa E47 junto con *Twist* para llevar a cabo su función sobre *Alx3*.

Por otro lado, hemos determinado que la caja Eb1 situada entre los nucleótidos -42 y -37 es un elemento regulador importante para la activación transcripcional del promotor de *Alx3*. *Twist* es incapaz de unirse a ella pero su integridad es necesaria para la actividad de *Twist* y E47. Por ello quisimos investigar qué otros factores bHLH se unen a la caja Eb1.

Un análisis detallado de la secuencia de la caja Eb1 reveló que ésta coincide con la secuencia consenso óptima para la unión del factor de transcripción USF1 (bHLH-LZ). El núcleo canónico de la secuencia de las cajas E (CANNTG) está conservado y frecuentemente los dos nucleótidos centrales (NN) son GC o CG. La proteína USF1 tiene una mayor afinidad por la secuencia CACGTG que por la otra combinación (Corre y Galibert, 2005). Los nucleótidos que rodean al núcleo CANNTG pueden afectar significativamente la especificidad de unión de las proteínas a las cajas E (Aksan y Goding, 1998). Se sabe que los sitios de unión de varios promotores regulados por

USF1 (Sawadogo y Roeder, 1985; Sato et al., 1989; Han et al., 2001; Jaiswal y Narayan, 2001; Ge et al., 2003) tienen los residuos AC en el extremo 3' del núcleo de la caja E. Estas observaciones indican que USF1 reconoce selectivamente la secuencia CACGTGAC que corresponde con la de la caja Eb1 de *Alx3* (Corre y Galibert, 2005).

Los resultados presentados en esta tesis indican que los factores USF1 y USF2 regulan la expresión de *Alx3*. Hemos determinado que la actividad de estos factores sobre el promotor de *Alx3* requiere de la integridad de la caja Eb1. Probablemente se unan a esta caja formando heterodímeros entre sí. Por otro lado, los ensayos de transfección transitoria mostraron que la adición de E47 o Twist no aumenta la actividad transcripcional generada por los factores USF, lo cual indica que la actividad ejercida a través de la caja Eb1 es independiente de la ejercida a través de la caja Eb2.

Nuestros datos muestran que la actividad de Twist y E47 sobre el promotor de *Alx3* requiere la integridad no sólo de la caja Eb2, a la cual se unen, sino también la de la caja Eb1, a la que se unen los factores USF. Esto puede ser explicado si estas cajas E actúan como un tandem funcional. Los resultados obtenidos con el dominante negativo de USF demuestran que es necesaria la actividad de los factores USF para que Twist y E47 ejerzan su función de estimulación de la expresión de *Alx3*. Por lo tanto, esto sugiere que estos factores de transcripción pueden interaccionar directamente o a través de una proteína puente, aún por determinar. Villavicencio et al. (2002) demostraron que los factores USF1 y USF2 colaboran con Twist en la regulación del gen *GLI1* que está implicado en la ruta de señalización dependiente de Sonic Hedgehog (SHH), de gran importancia en el desarrollo embrionario. En concreto, Twist junto con USF1 y USF2 activan el promotor del gen humano *GLI1* a través de su unión respectiva a dos cajas E situadas en su primer intrón de una forma similar a la observada en la regulación de *Alx3*.

Nuestros datos muestran que la presencia simultánea de USF1 y USF2 produce una activación sinérgica del promotor, que inesperadamente sólo se manifiesta cuando la caja Eb2 se encuentra mutada. Esto sugiere la posible existencia de un factor represor que se una a la caja Eb2 o a otra secuencia cercana a ella, y que actúe reprimiendo la actividad transcripcional dependiente de USF.

El análisis *in silico* del promotor de *Alx3* reveló la existencia de un sitio de unión al factor de transcripción Hes1 cuya secuencia (CTTGTGA) es adyacente a la caja Eb2 (-121 a -115). Hes1 es una proteína represora bHLH que desempeña un

papel esencial en el desarrollo del tubo neural (Hirata et al., 2001) y previene la neurogénesis prematura en el sistema nervioso (Kageyama et al., 2008; Ichi et al., 2010). Por todo ello, es posible que esta proteína actúe coordinadamente con Twist y E47 sobre la caja Eb2 para modular la actividad de los factores USF1 y USF2. Además, se ha descrito que durante el desarrollo del tubo neural caudal el ácido fólico interviene en la regulación de *Hes1* y *Neurog2* a través de mecanismos de remodelación de cromatina (Ichi et al., 2010). Por tanto, no puede descartarse que *Hes1* pueda participar en la regulación de la expresión de *Alx3* por ácido fólico durante el cierre del tubo neural (Lakhwani et al., 2010).

Todos estos resultados indican que la expresión de *Alx3* está regulada por una red compleja en la que participan diferentes moduladores y coactivadores aún por determinar.

5.5. *Alx3* y malformaciones congénitas asociadas a hiperglucemia.

La ausencia de malformaciones congénitas inducidas por hiperglucemia gestacional en animales *Alx3*^{+/+} son reflejo de la relativa resistencia de los embriones de la cepa utilizada a la embriopatía diabética (Pani et al., 2002a; Loeken, 2005). En estudios anteriores con ratones se determinó que la hiperglucemia materna no produce malformaciones en embriones de la cepa C57BL/6J, en comparación con embriones de otras cepas como FVB, ICR y 129/Sv, que sí son susceptibles al daño (Pani et al., 2002a). Por tanto, la resistencia a la embriopatía diabética depende del fondo genético del embrión y se trata de una característica dominante. Los animales utilizados en nuestros estudios son de una cepa híbrida C57BL/6J x FVB cuya resistencia se ha puesto de manifiesto en estudios anteriores (Loeken, 2005).

A pesar de la resistencia a la embriopatía diabética de la cepa utilizada, encontramos que los embriones deficientes en *Alx3* son vulnerables a la hiperglucemia, que induce en ellos malformaciones congénitas sorprendentemente más severas en comparación con los defectos del cierre del tubo neural que habíamos descrito previamente (Lakhwani et al., 2010). Por lo tanto, el modelo de embriopatía diabética utilizado en esta tesis nos ha permitido identificar a *Alx3* como un factor protector contra la aparición de malformaciones congénitas asociadas a la hiperglucemia materna.

Como ya hemos mencionado en la introducción, el estrés oxidativo y el exceso de especies reactivas de oxígeno podrían estar directamente relacionados con la aparición de malformaciones asociadas a la hiperglucemia durante la gestación. En nuestros estudios, la inducción de la expresión de los genes que codifican algunas enzimas como la manganeso superóxido dismutasa o la catalasa, que protegen frente al estrés oxidativo, están en concordancia con estudios similares realizados en rata en los que se determinó que los embriones de una cepa resistente desarrollados en condiciones de hiperglucemia presentaban incrementados los niveles de expresión de estas enzimas (Eriksson, 1988; Cederberg et al., 2000). La carencia de *Alx3* previene la inducción de la expresión de los genes que codifican estas enzimas antioxidantes, privando a los embriones de la protección proporcionada frente al estrés oxidativo causado por la diabetes gestacional.

La respuesta al estrés oxidativo está regulada en parte por los factores FoxO, ya que inducen la expresión de proteínas antioxidantes como la manganeso superóxido dismutasa y la catalasa (Storz, 2010). Además, el 68% de los promotores de los genes alterados en embriones desarrollados en condiciones de hiperglucemia gestacional contienen motivos conservados de unión de FoxO1 y FoxO4 (Pavlinkova et al., 2009). Nuestros datos indican que el aumento de la expresión de *FoxO1* y *FoxO4* en embriones sometidos a hiperglucemia gestacional está inhibido en ausencia de *Alx3*, de manera similar a lo que ocurre con la expresión de los genes que codifican las enzimas antioxidantes. Por tanto, *FoxO1* y *FoxO4* forman parte de los mecanismos protectores controlados por *Alx3*. Por lo tanto, todos estos resultados indican que existe una correlación inversa entre la aparición de malformaciones embrionarias inducidas por la hiperglucemia y los niveles relativos de expresión de genes que codifican las enzimas y factores de transcripción que protegen frente al estrés oxidativo. Esta correlación está alterada en los embriones deficientes de *Alx3*.

En relación con el estrés oxidativo, el óxido nítrico puede interaccionar con el anión superóxido (O_2^-), y dar lugar a un potente oxidante, el peroxinitrato ($ONOO^-$). Por otro lado, el óxido nítrico y, por lo tanto, la óxido nítrico sintetasa (NOS) son esenciales para el desarrollo del tubo neural (Lee y Juchau, 1994; Traister et al., 2002; Plachta et al., 2003). En nuestros estudios observamos que la hiperglucemia materna produce en los embriones una reducción en la expresión de la óxido nítrico sintetasa (NOS) con independencia de la presencia o ausencia de *Alx3*. La inhibición de NOS

produce dismorfogénesis en embriones de rata (Lee y Juchau, 1994), pero también se sabe que niveles elevados de NOS durante la organogénesis desempeñan un papel crucial en la patogénesis de las malformaciones inducidas por la diabetes a través de la producción excesiva de óxido nítrico que puede dar lugar a estrés oxidativo. En estas condiciones, la inhibición de NOS puede ayudar a prevenir estas malformaciones, en especial los defectos del cierre del tubo neural (Sugimura et al., 2009). Por lo tanto, el balance de los niveles de NOS y como consecuencia los del óxido nítrico es lo que determinará el correcto desarrollo del cierre del tubo neural. No obstante, nuestros resultados nos indican que *Alx3* no interviene en los mecanismos en los que participa NOS.

Se ha propuesto que el estrés oxidativo podría provocar alteraciones en la activación sincrónica de genes importantes en el control de la morfogénesis temprana y por tanto, los defectos congénitos se producirían por un mecanismo diferente al de la inducción directa de la muerte celular por daño oxidativo al material genético (Loeken, 2004; Li et al., 2007). Un de estos genes es *Pax3* (Epstein et al., 1991; Epstein et al., 1993) que codifica un factor de transcripción de tipo homeodominio perteneciente a la familia *paired*. Este gen participa en el cierre del tubo neural (Burren et al., 2008) y es necesario para la migración de las células de la cresta neural y la de los pericardios musculares (Daston et al., 1996; Morgan et al., 2008). Se ha observado que el estrés oxidativo como consecuencia de la hiperglucemia materna produce un descenso de la expresión de *Pax3*. La inhibición de *Pax3* conduce a la síntesis o la estabilidad de la proteína p53, dando lugar a un proceso de muerte celular y como consecuencia final la interrupción del cierre del tubo neural y un retraso en el crecimiento (Pani et al., 2002b; Chang et al., 2003; Li et al., 2005; Loeken, 2005).

Por todo ello, quisimos determinar si la carencia de *Alx3* podría alterar la expresión de *Pax3*. Encontramos que la hiperglucemia no produce ninguna diferencia en los niveles de expresión de *Pax3*. Estos datos coinciden con otros estudios que demuestran que la hiperglucemia materna no inhibe la expresión *Pax3* en los embriones de la cepa resistente C57BL/6J (Pani et al., 2002a). Además, como cabría esperar en embriones de una cepa resistente a la embriopatía diabética encontramos que la hiperglucemia produce un descenso en la expresión de p53 independientemente de la presencia de *Alx3* (Loeken, 2005). Estos resultados, indican

que *Alx3* no participa en la regulación de *Pax3*.

En relación con otros reguladores transcripcionales, encontramos que la hiperglucemia produce una reducción de la expresión de *AP2*, el cual es esencial para el desarrollo craneofacial (Schorle et al., 1996; Kohlbecker et al., 2002), que se acentuó aún más en ausencia de *Alx3*. Por otro lado, la hiperglucemia produce un aumento de la expresión de *Cited2* que es importante para la fusión de los pliegues neurales durante el desarrollo embrionario (Barbera et al., 2002). Sin embargo en embriones deficientes de *Alx3* se produce una inhibición de este aumento. Por tanto, la carencia de *Alx3* se acompaña de un déficit relativo de reguladores transcripcionales importantes para el desarrollo embrionario como *AP2* y *Cited2* que pueden acentuar aún más la vulnerabilidad de los tejidos embrionarios a la acción tóxica de la glucosa.

Este incremento de la vulnerabilidad embrionaria puede acentuarse aún más como consecuencia de la disminución de la expresión de factores importantes para el desarrollo de los mesénquimas o de la de sus receptores. Esta idea viene apoyada por la inhibición de la expresión de *BMP4* y *PDGFR α* en embriones deficientes de *Alx3*. *BMP4* participa en muchos procesos biológicos importantes durante el desarrollo embrionario (Hogan, 1996) y *PDGFR α* es necesario para la formación del mesénquima y hueso craneal (Smith y Tallquist, 2010) y para el desarrollo del corazón (Bax et al., 2010).

Estos resultados evidencian que hay una clara relación entre la aparición de malformaciones congénitas severas inducidas por la hiperglucemia en ausencia de *Alx3* y el descenso de expresión de genes implicados en la regulación de importantes procesos morfológicos durante el desarrollo embrionario.

Otro elemento que puede contribuir al incremento de la vulnerabilidad al daño embrionario en ausencia de *Alx3* es la disminución de la expresión del receptor de folato, *Folbp1*. Este receptor es importante para el transporte materno-fetal del folato durante la neurulación y para el transporte del folato dentro del tubo neural y el saco embrionario en desarrollo. Su carencia da lugar a alteraciones severas durante la embriogénesis (Piedrahita et al., 1999). También, se ha demostrado que la reducción en la expresión de este receptor durante el desarrollo embrionario produce malformaciones cardíacas (Rosenquist et al., 2010). Además, se ha descrito que la expresión de *Folbp1* está disminuida en embriones que se desarrollan en condiciones de hiperglucemia, lo que sugiere que este descenso da lugar a una deficiencia en ácido

fólico intracelular (Wentzel et al., 2005). No obstante, en nuestros estudios observamos que los embriones *Alx3^{+/+}* desarrollados en hiperglucemia no tienen disminuida la expresión de *Folbp1*, pudiendo esto contribuir a la ya mencionada resistencia de la cepa utilizada.

Como ya hemos mencionado anteriormente, el ácido fólico está implicado en mecanismos epigenéticos de la regulación de la expresión génica mediante la metilación del DNA (Ghoshal et al., 2006; Ichi et al., 2010). En relación con ello, el descenso en la expresión de DNMT3a obtenido en embriones que se desarrollan en un ambiente hiperglucémico, acentuado en ausencia en *Alx3*, podría contribuir a la aparición de las malformaciones observadas (Feng et al., 2010).

Finalmente, es posible que las malformaciones embrionarias observadas en embriones carentes de *Alx3* puedan ser en parte secundarias a defectos en la génesis de los vasos sanguíneos, lo cual comprometería el aporte de oxígeno y nutrientes al los tejidos en desarrollo. Este concepto se apoya en la observación de alteraciones vasculares en algunos embriones, así como de un descenso relativo de los niveles de expresión de VEGF1, factor esencial para la generación y mantenimiento de los vasos sanguíneos (Alon et al., 1995). Nuestros resultados coinciden con estudios anteriores que demostraron que una exposición a hiperglucemia durante el desarrollo temprano produce un descenso en los niveles de VEGF-1 que conduce a la aparición de una vasculopatía embrionaria (Pinter et al., 2001). VEGF1 es diana directa del factor de transcripción *Hif1 α* , un regulador calve en la respuesta embrionaria a hipoxia (Wenger y Gassmann, 1997; Iyer et al., 1998; Blancher et al., 2000).

Se sabe que además del estrés oxidativo también la hipoxia desempeña un papel importante en la patogénesis de la embriopatía diabética (Li et al., 2005). Por ello, no es de extrañar que un porcentaje importante de los genes que están afectados por la diabetes materna contengan en sus regiones distales potenciales sitios de unión de factores que están implicados en la respuesta a hipoxia (Pavlinkova et al., 2009). Por esta razón, también quisimos investigar si la expresión de *Hif1 α* estaba alterada en los embriones carentes de *Alx3* desarrollados en hiperglucemia. En primer lugar, encontramos que la hiperglucemia induce la expresión de *Hif1 α* en los embriones *Alx3^{+/+}*, lo cual está en concordancia con la existencia de hipoxia acentuada en los embriones desarrollados en ambiente hiperglucémico. La ausencia de *Alx3* inhibe la inducción de la expresión de *Hif1 α* por la hiperglucemia, lo cual sugiere que en estas

condiciones *Alx3* regula directamente la expresión de *Hif1 α* .

En conclusión, todos estos datos apoyan la idea de que *Alx3* es un gen con un papel importante en los mecanismos de defensa que previenen la embriopatía diabética, y su carencia constituye un factor de riesgo para la aparición de malformaciones congénitas durante hiperglucemia gestacional.

Estudios anteriores han demostrado que la suplementación con ácido fólico reduce la aparición de malformaciones embrionarias asociadas a diabetes materna durante el embarazo (Wentzel y Eriksson, 2005; Wentzel et al., 2005; Oyama et al., 2009). Puesto que la expresión de *Alx3* depende de la presencia del ácido fólico, decidimos investigar si la administración de ácido fólico durante la gestación podría reducir también la incidencia de malformaciones severas asociada a una disminución de los niveles de *Alx3* en condiciones de hiperglucemia.

Nuestros resultados demuestran que la expresión de *Alx3* es necesaria para que el ácido fólico lleve a cabo su papel preventivo en la disminución de las malformaciones embrionarias inducidas por la hiperglucemia materna, ya que éste sólo reduce la incidencia de estas malformaciones en los embriones heterocigotos desarrollados en condiciones de hiperglucemia y no en los embriones homocigotos carentes de *Alx3*.

Por todo ello, decidimos investigar si la administración de ácido fólico durante la gestación mejoraba la expresión de aquellos genes que habíamos demostrado que en hiperglucemia y en ausencia de *Alx3* estaba disminuida.

En embriones heterocigotos *Alx3*^{+/-} la administración materna de ácido fólico se tradujo en un modesto pero significativo aumento en la expresión de BMP4, DNTM3a y *Hif1 α* , lo cual sugiere que estos 3 genes contribuyen directamente al efecto protector del ácido fólico dependiente de la expresión de *Alx3*.

Conclusiones



6. CONCLUSIONES.

Las conclusiones de la presente tesis doctoral son las siguientes:

1. La expresión de *Alx3* es dependiente de la disponibilidad del ácido fólico *in vivo*.
2. *Alx3* constituye la primera diana no metabólica a través de la cual el ácido fólico ejerce su papel preventivo en la prevención de malformaciones congénitas, que incluyen defectos del cierre del tubo neural y embriopatía diabética.
3. Los defectos del cierre del tubo neural producidos por la carencia de *Alx3* se asocian a la existencia de una menor densidad del mesénquima craneofacial producida por un nivel excesivo de muerte celular.
4. Los factores de transcripción del tipo bHLH Twist, E47, USF1 y USF2 cooperan en la regulación transcripcional de *Alx3* a través de su unión a elementos situados en la región proximal del promotor.
5. La deficiencia de *Alx3* incrementa el riesgo de la aparición de malformaciones congénitas asociadas a hiperglucemia gestacional.
6. La expresión de *Alx3* durante el desarrollo embrionario es necesaria para la puesta en marcha de mecanismos de protección frente a estrés oxidativo producido por hiperglucemia de origen materno.

Bibliografía



7. BIBLIOGRAFÍA.

- Aberg A, Westbom L, Kallen B (2001) Congenital malformations among infants whose mothers had gestational diabetes or preexisting diabetes. *Early Hum Dev* 61:85-95.
- Akazawa S (2005) Diabetic embryopathy: studies using a rat embryo culture system and an animal model. *Congenit Anom (Kyoto)* 45:73-79.
- Akazawa S, Unterman T, Metzger BE (1994) Glucose metabolism in separated embryos and investing membranes during organogenesis in the rat. *Metabolism* 43:830-835.
- Aksan I, Goding CR (1998) Targeting the microphthalmia basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-box elements in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 18:6930-6938.
- Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E (1995) Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1:1024-1028.
- Atchley WR, Fitch WM (1997) A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5172-5176.
- Barbera JP, Rodriguez TA, Greene ND, Weninger WJ, Simeone A, Copp AJ, Beddington RS, Dunwoodie S (2002) Folic acid prevents exencephaly in Cited2 deficient mice. *Hum Mol Genet* 11:283-293.
- Barnes RM, Firulli AB (2009) A twist of insight - the role of Twist-family bHLH factors in development. *Int J Dev Biol* 53:909-924.
- Bax NA, Bleyl SB, Gallini R, Wisse LJ, Hunter J, Van Oorschot AA, Mahtab EA, Lie-Venema H, Goumans MJ, Betsholtz C, Gittenberger-de Groot AC (2010) Cardiac malformations in Pdgfralpha mutant embryos are associated with increased expression of WT1 and Nkx2.5 in the second heart field. *Dev Dyn* 239:2307-2317.
- Baxeianis AD, Vinson CR (1993) Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity? *Curr Opin Genet Dev* 3:278-285.
- Becerra JE, Khoury MJ, Cordero JF, Erickson JD (1990) Diabetes mellitus during pregnancy and the risks for specific birth defects: a population-based case-control study. *Pediatrics* 85:1-9.

- Bendall AJ, Molloy PL (1994) Base preferences for DNA binding by the bHLH-Zip protein USF: effects of MgCl₂ on specificity and comparison with binding of Myc family members. *Nucleic Acids Res* 22:2801-2810.
- Beverdam A, Meijlink F (2001) Expression patterns of group-I aristaless-related genes during craniofacial and limb development. *Mech Dev* 107:163-167.
- Beverdam A, Brouwer A, Reijnen M, Korving J, Meijlink F (2001) Severe nasal clefting and abnormal embryonic apoptosis in Alx3/Alx4 double mutant mice. *Development* 128:3975-3986.
- Bialek P, Kern B, Yang X, Schrock M, Sosic D, Hong N, Wu H, Yu K, Ornitz DM, Olson EN, Justice MJ, Karsenty G (2004) A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell* 6:423-435.
- Bildsoe H, Loebel DA, Jones VJ, Chen YT, Behringer RR, Tam PP (2009) Requirement for Twist1 in frontonasal and skull vault development in the mouse embryo. *Dev Biol* 331:176-188.
- Blancher C, Moore JW, Talks KL, Houlbrook S, Harris AL (2000) Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 60:7106-7113.
- Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, Finnell RH (2006) Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci* 7:724-731.
- Bourgeois P, Bolcato-Bellemin AL, Danse JM, Bloch-Zupan A, Yoshida K, Stoetzel C, Perrin-Schmitt F (1998) The variable expressivity and incomplete penetrance of the twist-null heterozygous mouse phenotype resemble those of human Saethre-Chotzen syndrome. *Hum Mol Genet* 7:945-957.
- Bradney C, Hjelmeland M, Komatsu Y, Yoshida M, Yao TP, Zhuang Y (2003) Regulation of E2A activities by histone acetyltransferases in B lymphocyte development. *J Biol Chem* 278:2370-2376.
- Burgoon JM, Selhub J, Nadeau M, Sadler TW (2002) Investigation of the effects of folate deficiency on embryonic development through the establishment of a folate deficient mouse model. *Teratology* 65:219-227.
- Burren KA, Savery D, Massa V, Kok RM, Scott JM, Blom HJ, Copp AJ, Greene ND (2008) Gene-environment interactions in the causation of neural tube

- defects: folate deficiency increases susceptibility conferred by loss of Pax3 function. *Hum Mol Genet* 17:3675-3685.
- Capobianco E, White V, Higa R, Martinez N, Jawerbaum A (2008) Effects of natural ligands of PPARgamma on lipid metabolism in placental tissues from healthy and diabetic rats. *Mol Hum Reprod* 14:491-499.
- Carthew RW, Chodosh LA, Sharp PA (1985) An RNA polymerase II transcription factor binds to an upstream element in the adenovirus major late promoter. *Cell* 43:439-448.
- Carver EA, Oram KF, Gridley T (2002) Craniosynostosis in Twist heterozygous mice: a model for Saethre-Chotzen syndrome. *Anat Rec* 268:90-92.
- Casado M, Vallet VS, Kahn A, Vaulont S (1999) Essential role in vivo of upstream stimulatory factors for a normal dietary response of the fatty acid synthase gene in the liver. *J Biol Chem* 274:2009-2013.
- Castanon I, Baylies MK (2002) A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function. *Gene* 287:11-22.
- Cederberg J, Galli J, Luthman H, Eriksson UJ (2000) Increased mRNA levels of Mn-SOD and catalase in embryos of diabetic rats from a malformation-resistant strain. *Diabetes* 49:101-107.
- Chang TI, Horal M, Jain SK, Wang F, Patel R, Loeken MR (2003) Oxidant regulation of gene expression and neural tube development: Insights gained from diabetic pregnancy on molecular causes of neural tube defects. *Diabetologia* 46:538-545.
- Chen ZF, Behringer RR (1995) twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev* 9:686-699.
- Ciarapica R, Rosati J, Cesareni G, Nasi S (2003) Molecular recognition in helix-loop-helix and helix-loop-helix-leucine zipper domains. Design of repertoires and selection of high affinity ligands for natural proteins. *J Biol Chem* 278:12182-12190.
- Cogswell JP, Godlevski MM, Bonham M, Bisi J, Babiss L (1995) Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle-dependent cyclin B1 gene promoter. *Mol Cell Biol* 15:2782-2790.
- Copp AJ, Greene ND, Murdoch JN (2003) Dishevelled: linking convergent extension with neural tube closure. *Trends Neurosci* 26:453-455.

- Corre S, Galibert MD (2005) Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Res* 18:337-348.
- Coulson JM, Edgson JL, Marshall-Jones ZV, Mulgrew R, Quinn JP, Woll PJ (2003) Upstream stimulatory factor activates the vasopressin promoter via multiple motifs, including a non-canonical E-box. *Biochem J* 369:549-561.
- Czeizel AE, Dudas I (1992) Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 327:1832-1835.
- Daston G, Lamar E, Olivier M, Goulding M (1996) Pax-3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse. *Development* 122:1017-1027.
- Davis RL, Cheng PF, Lassar AB, Weintraub H (1990) The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* 60:733-746.
- Eichholzer M, Tönz O, Zimmermann R (2006) Folic acid: a public-health challenge. *Lancet* 367:1352-1361.
- el Ghouzzi V, Le Merrer M, Perrin-Schmitt F, Lajeunie E, Benit P, Renier D, Bourgeois P, Bolcato-Bellemin AL, Munnich A, Bonaventure J (1997) Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 15:42-46.
- Ellenberger T, Fass D, Arnaud M, Harrison SC (1994) Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev* 8:970-980.
- Engstrom E, Haglund A, Eriksson UJ (1991) Effects of maternal diabetes or in vitro hyperglycemia on uptake of palmitic and arachidonic acid by rat embryos. *Pediatr Res* 30:150-153.
- Epstein DJ, Vekemans M, Gros P (1991) Splotch (Sp2H), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3. *Cell* 67:767-774.
- Epstein DJ, Vogan KJ, Trasler DG, Gros P (1993) A mutation within intron 3 of the Pax-3 gene produces aberrantly spliced mRNA transcripts in the splotch (Sp) mouse mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:532-536.

- Eriksson UJ (1988) Importance of genetic predisposition and maternal environment for the occurrence of congenital malformations in offspring of diabetic rats. *Teratology* 37:365-374.
- Eriksson UJ, Borg LA (1993) Diabetes and embryonic malformations. Role of substrate-induced free-oxygen radical production for dysmorphogenesis in cultured rat embryos. *Diabetes* 42:411-419.
- Eriksson UJ, Cederberg J, Wentzel P (2003) Congenital malformations in offspring of diabetic mothers--animal and human studies. *Rev Endocr Metab Disord* 4:79-93.
- Eriksson UJ, Borg LA, Forsberg H, Styrud J (1991) Diabetic embryopathy. Studies with animal and in vitro models. *Diabetes* 40 Suppl 2:94-98.
- Evers IM, de Valk HW, Visser GH (2004) Risk of complications of pregnancy in women with type 1 diabetes: nationwide prospective study in the Netherlands. *BMJ* 328:915.
- Farrell T, Neale L, Cundy T (2002) Congenital anomalies in the offspring of women with type 1, type 2 and gestational diabetes. *Diabet Med* 19:322-326.
- Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt JD, Silva AJ, Fan G (2010) Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci* 13:423-430.
- Ferre-D'Amare AR, Prendergast GC, Ziff EB, Burley SK (1993) Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature* 363:38-45.
- Fine EL, Horal M, Chang TI, Fortin G, Loeken MR (1999) Evidence that elevated glucose causes altered gene expression, apoptosis, and neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy. *Diabetes* 48:2454-2462.
- Finnell RH, Junker WM, Wadman LK, Cabrera RM (2002) Gene expression profiling within the developing neural tube. *Neurochem Res* 27:1165-1180.
- Firulli AB, Conway SJ (2008) Phosphoregulation of Twist1 provides a mechanism of cell fate control. *Curr Med Chem* 15:2641-2647.
- Firulli BA, Howard MJ, McDaid JR, McIlreavey L, Dionne KM, Centonze VE, Cserjesi P, Virshup DM, Firulli AB (2003) PKA, PKC, and the protein phosphatase 2A influence HAND factor function: a mechanism for tissue-specific transcriptional regulation. *Mol Cell* 12:1225-1237.

- Firulli BA, Krawchuk D, Centonze VE, Vargesson N, Virshup DM, Conway SJ, Cserjesi P, Laufer E, Firulli AB (2005) Altered Twist1 and Hand2 dimerization is associated with Saethre-Chotzen syndrome and limb abnormalities. *Nat Genet* 37:373-381.
- Fischer B, Bavister BD (1993) Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 99:673-679.
- Flora A, Garcia JJ, Thaller C, Zoghbi HY (2007) The E-protein Tcf4 interacts with Math1 to regulate differentiation of a specific subset of neuronal progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15382-15387.
- Freinkel N (1980) Banting Lecture 1980. Of pregnancy and progeny. *Diabetes* 29:1023-1035.
- Fuchtbauer EM (1995) Expression of M-twist during postimplantation development of the mouse. *Dev Dyn* 204:316-322.
- Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T (2003) The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 31:2305-2312.
- Gao E, Wang Y, Alcorn JL, Mendelson CR (2003) Transcription factor USF2 is developmentally regulated in fetal lung and acts together with USF1 to induce SP-A gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:L1027-1036.
- Gareskog M, Wentzel P (2004) Altered protein kinase C activation associated with rat embryonic dysmorphogenesis. *Pediatr Res* 56:849-857.
- Gareskog M, Cederberg J, Eriksson UJ, Wentzel P (2007) Maternal diabetes in vivo and high glucose concentration in vitro increases apoptosis in rat embryos. *Reprod Toxicol* 23:63-74.
- Ge Y, Jensen TL, Matherly LH, Taub JW (2003) Physical and functional interactions between USF and Sp1 proteins regulate human deoxycytidine kinase promoter activity. *J Biol Chem* 278:49901-49910.
- Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, Affolter M, Otting G, Wuthrich K (1994) Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78:211-223.
- Ghoshal K, Li X, Datta J, Bai S, Pogribny I, Pogribny M, Huang Y, Young D, Jacob ST (2006) A folate- and methyl-deficient diet alters the expression of DNA

- methyltransferases and methyl CpG binding proteins involved in epigenetic gene silencing in livers of F344 rats. *J Nutr* 136:1522-1527.
- Gitelman I (1997) Twist protein in mouse embryogenesis. *Dev Biol* 189:205-214.
- Goardon N, Lambert JA, Rodriguez P, Nissaire P, Herblot S, Thibault P, Dumenil D, Strouboulis J, Romeo PH, Hoang T (2006) ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *EMBO J* 25:357-366.
- Goldfarb AN, Lewandowska K, Pennell CA (1998) Identification of a highly conserved module in E proteins required for in vivo helix-loop-helix dimerization. *J Biol Chem* 273:2866-2873.
- Goldman AS, Baker L, Piddington R, Marx B, Herold R, Egler J (1985) Hyperglycemia-induced teratogenesis is mediated by a functional deficiency of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:8227-8231.
- Gordon R (1985) A review of the theories of vertebrate neurulation and their relationship to the mechanics of neural tube birth defects. *J Embryol Exp Morphol* 89 Suppl:229-255.
- Greene MF (2001) Diabetic embryopathy 2001: moving beyond the "diabetic milieu". *Teratology* 63:116-118.
- Gregor PD, Sawadogo M, Roeder RG (1990) The adenovirus major late transcription factor USF is a member of the helix-loop-helix group of regulatory proteins and binds to DNA as a dimer. *Genes Dev* 4:1730-1740.
- Groenen PM, Garcia E, Debeer P, Devriendt K, Fryns JP, Van de Ven WJ (1996) Structure, sequence, and chromosome 19 localization of human USF2 and its rearrangement in a patient with multicystic renal dysplasia. *Genomics* 38:141-148.
- Guillemot F, Lo LC, Johnson JE, Auerbach A, Anderson DJ, Joyner AL (1993) Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75:463-476.
- Hamamori Y, Wu HY, Sartorelli V, Kedes L (1997) The basic domain of myogenic basic helix-loop-helix (bHLH) proteins is the novel target for direct inhibition by another bHLH protein, Twist. *Mol Cell Biol* 17:6563-6573.
- Han SY, Kim JC, Suh JM, Chung IK (2001) Cell type-dependent regulation of human DNA topoisomerase III alpha gene expression by upstream stimulatory factor 2. *FEBS Lett* 505:57-62.

- Harris MJ, Juriloff DM (2010) An update to the list of mouse mutants with neural tube closure defects and advances toward a complete genetic perspective of neural tube closure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88:653-669.
- Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, Klein WH (1993) Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364:501-506.
- Higa R, Gonzalez E, Pustovrh MC, White V, Capobianco E, Martinez N, Jawerbaum A (2007) PPARdelta and its activator PGI2 are reduced in diabetic embryopathy: involvement of PPARdelta activation in lipid metabolic and signalling pathways in rat embryo early organogenesis. *Mol Hum Reprod* 13:103-110.
- Hiramatsu Y, Sekiguchi N, Hayashi M, Isshiki K, Yokota T, King GL, Loeken MR (2002) Diacylglycerol production and protein kinase C activity are increased in a mouse model of diabetic embryopathy. *Diabetes* 51:2804-2810.
- Hirata H, Tomita K, Bessho Y, Kageyama R (2001) Hes1 and Hes3 regulate maintenance of the isthmus organizer and development of the mid/hindbrain. *EMBO J* 20:4454-4466.
- Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA, Arnheiter H (1993) Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 74:395-404.
- Hogan BL (1996) Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10:1580-1594.
- Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, Ortiz de Luna RI, Garcia Delgado C, Gonzalez-Ramos M, Kline AD, Jabs EW (1997) Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 15:36-41.
- Howcroft TK, Murphy C, Weissman JD, Huber SJ, Sawadogo M, Singer DS (1999) Upstream stimulatory factor regulates major histocompatibility complex class I gene expression: the U2DeltaE4 splice variant abrogates E-box activity. *Mol Cell Biol* 19:4788-4797.

- Ichi S, Costa FF, Bischof JM, Nakazaki H, Shen YW, Boshnjaku V, Sharma S, Mania-Farnell B, McLone DG, Tomita T, Soares MB, Mayanil CS (2010) Folic acid remodels chromatin on Hes1 and Neurog2 promoters during caudal neural tube development. *J Biol Chem* 285:36922-36932.
- Inman KE, Downs KM (2007) The murine allantois: emerging paradigms in development of the mammalian umbilical cord and its relation to the fetus. *Genesis* 45:237-258.
- Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 12:149-162.
- Jaiswal AS, Narayan S (2001) Upstream stimulating factor-1 (USF1) and USF2 bind to and activate the promoter of the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor gene. *J Cell Biochem* 81:262-277.
- Jeong J, Li X, McEvilly RJ, Rosenfeld MG, Lufkin T, Rubenstein JL (2008) Dlx genes pattern mammalian jaw primordium by regulating both lower jaw-specific and upper jaw-specific genetic programs. *Development* 135:2905-2916.
- Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, Di Padova F, Lin SC, Gram H, Han J (2005) Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* 120:623-634.
- Johnson D, Horsley SW, Moloney DM, Oldridge M, Twigg SR, Walsh S, Barrow M, Njolstad PR, Kunz J, Ashworth GJ, Wall SA, Kearney L, Wilkie AO (1998) A comprehensive screen for TWIST mutations in patients with craniosynostosis identifies a new microdeletion syndrome of chromosome band 7p21.1. *Am J Hum Genet* 63:1282-1293.
- Jones KA, Kadonaga JT (2000) Exploring the transcription-chromatin interface. *Genes Dev* 14:1992-1996.
- Jones S (2004) An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol* 5:226.
- Jugessur A, Shi M, Gjessing HK, Lie RT, Wilcox AJ, Weinberg CR, Christensen K, Boyles AL, Daack-Hirsch S, Trung TN, Bille C, Lidral AC, Murray JC (2009) Genetic determinants of facial clefting: analysis of 357 candidate genes using two national cleft studies from Scandinavia. *PLoS One* 4:e5385.

- Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T (2008) Roles of Hes genes in neural development. *Dev Growth Differ* 50 Suppl 1:S97-103.
- Kayserili H, Uz E, Niessen C, Vargel I, Alanay Y, Tuncbilek G, Yigit G, Uyguner O, Candan S, Okur H, Kaygin S, Balci S, Mavili E, Alikasifoglu M, Haase I, Wollnik B, Akarsu NA (2009) ALX4 dysfunction disrupts craniofacial and epidermal development. *Hum Mol Genet* 18:4357-4366.
- Kirschbaum BJ, Pognonec P, Roeder RG (1992) Definition of the transcriptional activation domain of recombinant 43-kilodalton USF. *Mol Cell Biol* 12:5094-5101.
- Kohlbecker A, Lee AE, Schorle H (2002) Exencephaly in a subset of animals heterozygous for AP-2alpha mutation. *Teratology* 65:213-218.
- Kumari D, Gabrielian A, Wheeler D, Usdin K (2005) The roles of Sp1, Sp3, USF1/USF2 and NRF-1 in the regulation and three-dimensional structure of the Fragile X mental retardation gene promoter. *Biochem J* 386:297-303.
- Lakhwani S, Garcia-Sanz P, Vallejo M (2010) Alx3-deficient mice exhibit folic acid-resistant craniofacial midline and neural tube closure defects. *Dev Biol* 344:869-880.
- Laurila PP, Naukkarinen J, Kristiansson K, Ripatti S, Kauttu T, Silander K, Salomaa V, Perola M, Karhunen PJ, Barter PJ, Ehnholm C, Peltonen L (2010) Genetic association and interaction analysis of USF1 and APOA5 on lipid levels and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:346-352.
- Laursen KB, Mielke E, Iannaccone P, Fuchtbauer EM (2007) Mechanism of transcriptional activation by the proto-oncogene Twist1. *J Biol Chem* 282:34623-34633.
- Lee MS, Lowe G, Flanagan S, Kuchler K, Glackin CA (2000) Human Dermo-1 has attributes similar to twist in early bone development. *Bone* 27:591-602.
- Lee QP, Juchau MR (1994) Dysmorphogenic effects of nitric oxide (NO) and NO-synthase inhibition: studies with intra-amniotic injections of sodium nitroprusside and NG-monomethyl-L-arginine. *Teratology* 49:452-464.
- Lee S, Seto M, Sie K, Cunningham M (2002) A child with Saethre-Chotzen syndrome, sensorineural hearing loss, and a TWIST mutation. *Cleft Palate Craniofac J* 39:110-114.

- Li L, Cserjesi P, Olson EN (1995) Dermo-1: a novel twist-related bHLH protein expressed in the developing dermis. *Dev Biol* 172:280-292.
- Li R, Thorens B, Loeken MR (2007) Expression of the gene encoding the high-Km glucose transporter 2 by the early postimplantation mouse embryo is essential for neural tube defects associated with diabetic embryopathy. *Diabetologia* 50:682-689.
- Li R, Chase M, Jung SK, Smith PJ, Loeken MR (2005) Hypoxic stress in diabetic pregnancy contributes to impaired embryo gene expression and defective development by inducing oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E591-599.
- Lin W, Zhang Z, Srajer G, Chen YC, Huang M, Phan HM, Dent SY (2008) Proper expression of the Gcn5 histone acetyltransferase is required for neural tube closure in mouse embryos. *Dev Dyn* 237:928-940.
- Liu S, Shi L, Wang S (2007) Overexpression of upstream stimulatory factor 2 accelerates diabetic kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F1727-1735.
- Loebel DA, O'Rourke MP, Steiner KA, Banyer J, Tam PP (2002) Isolation of differentially expressed genes from wild-type and Twist mutant mouse limb buds. *Genesis* 33:103-113.
- Loeken MR (2004) Free radicals and birth defects. *J Matern Fetal Neonatal Med* 15:6-14.
- Loeken MR (2005) Current perspectives on the causes of neural tube defects resulting from diabetic pregnancy. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 135C:77-87.
- Loffredo CA, Wilson PD, Ferencz C (2001) Maternal diabetes: an independent risk factor for major cardiovascular malformations with increased mortality of affected infants. *Teratology* 64:98-106.
- Longo A, Guanga GP, Rose RB (2008) Crystal structure of E47-NeuroD1/beta2 bHLH domain-DNA complex: heterodimer selectivity and DNA recognition. *Biochemistry* 47:218-229.
- Lu MF, Cheng HT, Kern MJ, Potter SS, Tran B, Diekwisch TG, Martin JF (1999) prx-1 functions cooperatively with another paired-related homeobox gene, prx-2,

- to maintain cell fates within the craniofacial mesenchyme. *Development* 126:495-504.
- Luo X, Sawadogo M (1996) Antiproliferative properties of the USF family of helix-loop-helix transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1308-1313.
- Macintosh MC, Fleming KM, Bailey JA, Doyle P, Modder J, Acolet D, Golightly S, Miller A (2006) Perinatal mortality and congenital anomalies in babies of women with type 1 or type 2 diabetes in England, Wales, and Northern Ireland: population based study. *BMJ* 333:177.
- Magklara A, Smith CL (2009) A composite intronic element directs dynamic binding of the progesterone receptor and GATA-2. *Mol Endocrinol* 23:61-73.
- Manley NR, Barrow JR, Zhang T, Capecchi MR (2001) Hoxb2 and hoxb4 act together to specify ventral body wall formation. *Dev Biol* 237:130-144.
- Martínez N, Capobianco E, White V, Pustovrh MC, Higa R, Jawerbaum A (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation regulates lipid metabolism in the feto-placental unit from diabetic rats. *Reproduction* 136:95-103.
- Martínez-Frias ML (1994) Epidemiological analysis of outcomes of pregnancy in diabetic mothers: identification of the most characteristic and most frequent congenital anomalies. *Am J Med Genet* 51:108-113.
- Massari ME, Murre C (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20:429-440.
- Menon KM, Munshi UM, Clouser CL, Nair AK (2004) Regulation of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor expression: a perspective. *Biol Reprod* 70:861-866.
- Metzger BE, Buchanan TA, Coustan DR, de Leiva A, Dunger DB, Hadden DR, Hod M, Kitzmiller JL, Kjos SL, Oats JN, Pettitt DJ, Sacks DA, Zoupas C (2007) Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 30 Suppl 2:S251-260.
- Mills JL (1982) Malformations in infants of diabetic mothers. *Teratology* 25:385-394.

- Mills JL, Baker L, Goldman AS (1979) Malformations in infants of diabetic mothers occur before the seventh gestational week. Implications for treatment. *Diabetes* 28:292-293.
- Miodovnik M, Mimouni F, Tsang RC, Holroyde J (1988) Diabetes and spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 158:1241-1242.
- Mirasierra M, Vallejo M (2006) The homeoprotein Alx3 expressed in pancreatic beta-cells regulates insulin gene transcription by interacting with the basic helix-loop-helix protein E47. *Mol Endocrinol* 20:2876-2889.
- Mirasierra M, Fernandez-Perez A, Diaz-Prieto N, Vallejo M (2011) Alx3-deficient mice exhibit decreased insulin in beta cells, altered glucose homeostasis and increased apoptosis in pancreatic islets. *Diabetologia* En prensa DOI: 101007/s00125-010-1975-6.
- Moley KH, Chi MM, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Mueckler MM (1998) Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. *Nat Med* 4:1421-1424.
- Moncollin V, Miyamoto NG, Zheng XM, Egly JM (1986) Purification of a factor specific for the upstream element of the adenovirus-2 major late promoter. *EMBO J* 5:2577-2584.
- Moore LL, Singer MR, Bradlee ML, Rothman KJ, Milunsky A (2000) A prospective study of the risk of congenital defects associated with maternal obesity and diabetes mellitus. *Epidemiology* 11:689-694.
- Morgan SC, Lee HY, Relaix F, Sandell LL, Levorse JM, Loeken MR (2008) Cardiac outflow tract septation failure in Pax3-deficient embryos is due to p53-dependent regulation of migrating cardiac neural crest. *Mech Dev* 125:757-767.
- Morriss GM, Solursh M (1978) Regional differences in mesenchymal cell morphology and glycosaminoglycans in early neural-fold stage rat embryos. *J Embryol Exp Morphol* 46:37-52.
- Murayama A, Kim MS, Yanagisawa J, Takeyama K, Kato S (2004) Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J* 23:1598-1608.
- Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, et al. (1989) Interactions between heterologous

- helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58:537-544.
- Nielsen GL, Norgard B, Puho E, Rothman KJ, Sorensen HT, Czeizel AE (2005) Risk of specific congenital abnormalities in offspring of women with diabetes. *Diabet Med* 22:693-696.
- O'Rourke MP, Soo K, Behringer RR, Hui CC, Tam PP (2002) Twist plays an essential role in FGF and SHH signal transduction during mouse limb development. *Dev Biol* 248:143-156.
- Oyama K, Sugimura Y, Murase T, Uchida A, Hayasaka S, Oiso Y, Murata Y (2009) Folic acid prevents congenital malformations in the offspring of diabetic mice. *Endocr J* 56:29-37.
- Pajukanta P, Lilja HE, Sinsheimer JS, Cantor RM, Lusi AJ, Gentile M, Duan XJ, Soro-Paavonen A, Naukkarinen J, Saarela J, Laakso M, Ehnholm C, Taskinen MR, Peltonen L (2004) Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat Genet* 36:371-376.
- Pani L, Horal M, Loeken MR (2002a) Polymorphic susceptibility to the molecular causes of neural tube defects during diabetic embryopathy. *Diabetes* 51:2871-2874.
- Pani L, Horal M, Loeken MR (2002b) Rescue of neural tube defects in Pax-3-deficient embryos by p53 loss of function: implications for Pax-3-dependent development and tumorigenesis. *Genes Dev* 16:676-680.
- Pavlinkova G, Salbaum JM, Kappen C (2009) Maternal diabetes alters transcriptional programs in the developing embryo. *BMC Genomics* 10:274.
- Pawar SA, Szentirmay MN, Hermeking H, Sawadogo M (2004) Evidence for a cancer-specific switch at the CDK4 promoter with loss of control by both USF and c-Myc. *Oncogene* 23:6125-6135.
- Pedersen JF, Molsted-Pedersen L (1979) Early growth retardation in diabetic pregnancy. *Br Med J* 1:18-19.
- Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA, Cano A (2001) A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 276:27424-27431.

- Perez-Villamil B, Mirasierra M, Vallejo M (2004) The homeoprotein Alx3 contains discrete functional domains and exhibits cell-specific and selective monomeric binding and transactivation. *J Biol Chem* 279:38062-38071.
- Phelan SA, Ito M, Loeken MR (1997) Neural tube defects in embryos of diabetic mice: role of the Pax-3 gene and apoptosis. *Diabetes* 46:1189-1197.
- Piedrahita JA, Oetama B, Bennett GD, van Waes J, Kamen BA, Richardson J, Lacey SW, Anderson RG, Finnell RH (1999) Mice lacking the folic acid-binding protein Folbp1 are defective in early embryonic development. *Nat Genet* 23:228-232.
- Pinter E, Haigh J, Nagy A, Madri JA (2001) Hyperglycemia-induced vasculopathy in the murine conceptus is mediated via reductions of VEGF-A expression and VEGF receptor activation. *Am J Pathol* 158:1199-1206.
- Plachta N, Traister A, Weil M (2003) Nitric oxide is involved in establishing the balance between cell cycle progression and cell death in the developing neural tube. *Exp Cell Res* 288:354-362.
- Portois L, Tastenoy M, Viollet B, Svoboda M (2002) Functional analysis of the glucose response element of the rat glucagon receptor gene in insulin-producing INS-1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1574:175-186.
- Putt W, Palmen J, Nicaud V, Tregouet DA, Tahri-Daizadeh N, Flavell DM, Humphries SE, Talmud PJ (2004) Variation in USF1 shows haplotype effects, gene : gene and gene : environment associations with glucose and lipid parameters in the European Atherosclerosis Research Study II. *Hum Mol Genet* 13:1587-1597.
- Qiu Y, Sharma A, Stein R (1998) p300 mediates transcriptional stimulation by the basic helix-loop-helix activators of the insulin gene. *Mol Cell Biol* 18:2957-2964.
- Qu S, Li L, Wisdom R (1997a) Alx-4: cDNA cloning and characterization of a novel paired-type homeodomain protein. *Gene* 203:217-223.
- Qu S, Tucker SC, Zhao Q, deCrombrugghe B, Wisdom R (1999) Physical and genetic interactions between Alx4 and Cart1. *Development* 126:359-369.
- Qu S, Niswender KD, Ji Q, van der Meer R, Keeney D, Magnuson MA, Wisdom R (1997b) Polydactyly and ectopic ZPA formation in Alx-4 mutant mice. *Development* 124:3999-4008.

- Qu S, Tucker SC, Ehrlich JS, Levorse JM, Flaherty LA, Wisdom R, Vogt TF (1998) Mutations in mouse *Aristaless-like4* cause Strong's luxoid polydactyly. *Development* 125:2711-2721.
- Qyang Y, Luo X, Lu T, Ismail PM, Krylov D, Vinson C, Sawadogo M (1999) Cell-type-dependent activity of the ubiquitous transcription factor USF in cellular proliferation and transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 19:1508-1517.
- Read ML, Clark AR, Docherty K (1993) The helix-loop-helix transcription factor USF (upstream stimulating factor) binds to a regulatory sequence of the human insulin gene enhancer. *Biochem J* 295 (Pt 1):233-237.
- Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E (1992) Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 80:283-285.
- Rosenquist TH, Chaudoin T, Finnell RH, Bennett GD (2010) High-affinity folate receptor in cardiac neural crest migration: a gene knockdown model using siRNA. *Dev Dyn* 239:1136-1144.
- Roth U, Jungermann K, Kietzmann T (2004) Modulation of glucokinase expression by hypoxia-inducible factor 1 and upstream stimulatory factor 2 in primary rat hepatocytes. *Biol Chem* 385:239-247.
- Rudnick A, Ling TY, Odagiri H, Rutter WJ, German MS (1994) Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12203-12207.
- Saito T, Oishi T, Yanai K, Shimamoto Y, Fukamizu A (2003) Cloning and characterization of a novel splicing isoform of USF1. *Int J Mol Med* 12:161-167.
- Sanchez AP, Sharma K (2009) Transcription factors in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Expert Rev Mol Med* 11:e13.
- Sato M, Fukushi Y, Ishizawa S, Okinaga S, Muller RM, Shibahara S (1989) Transcriptional control of the rat heme oxygenase gene by a nuclear protein that interacts with adenovirus 2 major late promoter. *J Biol Chem* 264:10251-10260.
- Sawadogo M (1988) Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. II. DNA binding properties and transcriptional activity of the purified HeLa USF. *J Biol Chem* 263:11994-12001.

- Sawadogo M, Roeder RG (1985) Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell* 43:165-175.
- Sawadogo M, Van Dyke MW, Gregor PD, Roeder RG (1988) Multiple forms of the human gene-specific transcription factor USF. I. Complete purification and identification of USF from HeLa cell nuclei. *J Biol Chem* 263:11985-11993.
- Schaefer-Graf UM, Buchanan TA, Xiang A, Songster G, Montoro M, Kjos SL (2000) Patterns of congenital anomalies and relationship to initial maternal fasting glucose levels in pregnancies complicated by type 2 and gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 182:313-320.
- Schoenfeld A, Erman A, Warchaizer S, Ovadia J, Bonner G, Hod M (1995) Yolk sac concentration of prostaglandin E2 in diabetic pregnancy: further clues to the etiology of diabetic embryopathy. *Prostaglandins* 50:121-126.
- Schorle H, Meier P, Buchert M, Jaenisch R, Mitchell PJ (1996) Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* 381:235-238.
- Sha M, Ferre-D'Amare AR, Burley SK, Goss DJ (1995) Anti-cooperative biphasic equilibrium binding of transcription factor upstream stimulatory factor to its cognate DNA monitored by protein fluorescence changes. *J Biol Chem* 270:19325-19329.
- Shirakata M, Friedman FK, Wei Q, Paterson BM (1993) Dimerization specificity of myogenic helix-loop-helix DNA-binding factors directed by nonconserved hydrophilic residues. *Genes Dev* 7:2456-2470.
- Siman CM, Eriksson UJ (1997) Vitamin E decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. *Diabetes* 46:1054-1061.
- Simpson P (1983) Maternal-Zygotic Gene Interactions during Formation of the Dorsoventral Pattern in *Drosophila* Embryos. *Genetics* 105:615-632.
- Sirito M, Lin Q, Maity T, Sawadogo M (1994) Ubiquitous expression of the 43- and 44-kDa forms of transcription factor USF in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 22:427-433.
- Sirito M, Lin Q, Deng JM, Behringer RR, Sawadogo M (1998) Overlapping roles and asymmetrical cross-regulation of the USF proteins in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3758-3763.

- Sirito M, Walker S, Lin Q, Kozlowski MT, Klein WH, Sawadogo M (1992) Members of the USF family of helix-loop-helix proteins bind DNA as homo- as well as heterodimers. *Gene Expr* 2:231-240.
- Smith CL, Tallquist MD (2010) PDGF function in diverse neural crest cell populations. *Cell Adh Migr* 4.
- Soo K, O'Rourke MP, Khoo PL, Steiner KA, Wong N, Behringer RR, Tam PP (2002) Twist function is required for the morphogenesis of the cephalic neural tube and the differentiation of the cranial neural crest cells in the mouse embryo. *Dev Biol* 247:251-270.
- Spicer DB, Rhee J, Cheung WL, Lassar AB (1996) Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist. *Science* 272:1476-1480.
- Staton JM, Thomson AM, Leedman PJ (2000) Hormonal regulation of mRNA stability and RNA-protein interactions in the pituitary. *J Mol Endocrinol* 25:17-34.
- Stoetzel C, Weber B, Bourgeois P, Bolcato-Bellemin AL, Perrin-Schmitt F (1995) Dorso-ventral and rostro-caudal sequential expression of M-twist in the postimplantation murine embryo. *Mech Dev* 51:251-263.
- Storz P (2010) Forkhead Homeobox Type O Transcription Factors in the Responses to Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*.
- Sugimura Y, Murase T, Oyama K, Uchida A, Sato N, Hayasaka S, Kano Y, Takagishi Y, Hayashi Y, Oiso Y, Murata Y (2009) Prevention of neural tube defects by loss of function of inducible nitric oxide synthase in fetuses of a mouse model of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 52:962-971.
- Suhonen L, Hiilesmaa V, Teramo K (2000) Glycaemic control during early pregnancy and fetal malformations in women with type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 43:79-82.
- Takahashi K, Nishiyama C, Nishiyama M, Okumura K, Ra C, Ohtake Y, Yokota T (2001) A complex composed of USF1 and USF2 activates the human FcepsilonRI alpha chain expression via a CAGCTG element in the first intron. *Eur J Immunol* 31:590-599.
- Takahashi M, Tamura K, Buscher D, Masuya H, Yonei-Tamura S, Matsumoto K, Naitoh-Matsuo M, Takeuchi J, Ogura K, Shiroishi T, Ogura T, Izpisua

- Belmonte JC (1998) The role of Alx-4 in the establishment of anteroposterior polarity during vertebrate limb development. *Development* 125:4417-4425.
- ten Berge D, Brouwer A, el Bahi S, Guenet JL, Robert B, Meijlink F (1998) Mouse Alx3: an aristaless-like homeobox gene expressed during embryogenesis in ectomesenchyme and lateral plate mesoderm. *Dev Biol* 199:11-25.
- Thisse B, Stoetzel C, Gorostiza-Thisse C, Perrin-Schmitt F (1988) Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos. *EMBO J* 7:2175-2183.
- Traister A, Abashidze S, Gold V, Plachta N, Karchovsky E, Patel K, Weil M (2002) Evidence that nitric oxide regulates cell-cycle progression in the developing chick neuroepithelium. *Dev Dyn* 225:271-276.
- Tucker SC, Wisdom R (1999) Site-specific heterodimerization by paired class homeodomain proteins mediates selective transcriptional responses. *J Biol Chem* 274:32325-32332.
- Twigg SR, Versnel SL, Nurnberg G, Lees MM, Bhat M, Hammond P, Hennekam RC, Hoozeboom AJ, Hurst JA, Johnson D, Robinson AA, Scambler PJ, Gerrelli D, Nurnberg P, Mathijssen IM, Wilkie AO (2009) Frontorhiny, a distinctive presentation of frontonasal dysplasia caused by recessive mutations in the ALX3 homeobox gene. *Am J Hum Genet* 84:698-705.
- Verzi MP, Anderson JP, Dodou E, Kelly KK, Greene SB, North BJ, Cripps RM, Black BL (2002) N-twist, an evolutionarily conserved bHLH protein expressed in the developing CNS, functions as a transcriptional inhibitor. *Dev Biol* 249:174-190.
- Viana M, Herrera E, Bonet B (1996) Teratogenic effects of diabetes mellitus in the rat. Prevention by vitamin E. *Diabetologia* 39:1041-1046.
- Viollet B, Lefrancois-Martinez AM, Henrion A, Kahn A, Raymondjean M, Martinez A (1996) Immunochemical characterization and transacting properties of upstream stimulatory factor isoforms. *J Biol Chem* 271:1405-1415.
- Voronova A, Baltimore D (1990) Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4722-4726.

- Watada H, Kajimoto Y, Umayahara Y, Matsuoka T, Morishima T, Yamasaki Y, Kawamori R, Kamada T (1995) Ubiquitous, but variable, expression of two alternatively spliced mRNAs encoding mouse homologues of transcription factors E47 and E12. *Gene* 153:255-259.
- Weintraub H, Dwarki VJ, Verma I, Davis R, Hollenberg S, Snider L, Lassar A, Tapscott SJ (1991) Muscle-specific transcriptional activation by MyoD. *Genes Dev* 5:1377-1386.
- Weksler-Zangen S, Yaffe P, Ornoy A (2003) Reduced SOD activity and increased neural tube defects in embryos of the sensitive but not of the resistant Cohen diabetic rats cultured under diabetic conditions. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 67:429-437.
- Wenger RH, Gassmann M (1997) Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem* 378:609-616.
- Wentzel P, Eriksson UJ (2005) A diabetes-like environment increases malformation rate and diminishes prostaglandin E(2) in rat embryos: reversal by administration of vitamin E and folic acid. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73:506-511.
- Wentzel P, Welsh N, Eriksson UJ (1999) Developmental damage, increased lipid peroxidation, diminished cyclooxygenase-2 gene expression, and lowered prostaglandin E2 levels in rat embryos exposed to a diabetic environment. *Diabetes* 48:813-820.
- Wentzel P, Gareskog M, Eriksson UJ (2005) Folic acid supplementation diminishes diabetes- and glucose-induced dysmorphogenesis in rat embryos in vivo and in vitro. *Diabetes* 54:546-553.
- Werler MM, Louik C, Shapiro S, Mitchell AA (1996) Prepregnant weight in relation to risk of neural tube defects. *JAMA* 275:1089-1092.
- West AG, Huang S, Gaszner M, Litt MD, Felsenfeld G (2004) Recruitment of histone modifications by USF proteins at a vertebrate barrier element. *Mol Cell* 16:453-463.
- Wilson D, Sheng G, Lecuit T, Dostatni N, Desplan C (1993) Cooperative dimerization of paired class homeo domains on DNA. *Genes Dev* 7:2120-2134.

- Wilson ME, Scheel D, German MS (2003) Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech Dev* 120:65-80.
- Wimmer K, Zhu Xx XX, Rouillard JM, Ambros PF, Lamb BJ, Kuick R, Eckart M, Weinhausl A, Fonatsch C, Hanash SM (2002) Combined restriction landmark genomic scanning and virtual genome scans identify a novel human homeobox gene, ALX3, that is hypermethylated in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 33:285-294.
- Wolberger C (1996) Homeodomain interactions. *Curr Opin Struct Biol* 6:62-68.
- Wolf C, Thisse C, Stoetzel C, Thisse B, Gerlinger P, Perrin-Schmitt F (1991) The M-twist gene of Mus is expressed in subsets of mesodermal cells and is closely related to the Xenopus X-twi and the Drosophila twist genes. *Dev Biol* 143:363-373.
- Wolffe AP, Hansen JC (2001) Nuclear visions: functional flexibility from structural instability. *Cell* 104:631-634.
- Wu S, Mar-Heyming R, Dugum EZ, Kolaitis NA, Qi H, Pajukanta P, Castellani LW, Lusis AJ, Drake TA (2010) Upstream transcription factor 1 influences plasma lipid and metabolic traits in mice. *Hum Mol Genet* 19:597-608.
- Wyman A, Pinto AB, Sheridan R, Moley KH (2008) One-cell zygote transfer from diabetic to nondiabetic mouse results in congenital malformations and growth retardation in offspring. *Endocrinology* 149:466-469.
- Yang X, Borg LA, Eriksson UJ (1995) Altered mitochondrial morphology of rat embryos in diabetic pregnancy. *Anat Rec* 241:255-267.
- Yang X, Borg LA, Siman CM, Eriksson UJ (1998) Maternal antioxidant treatments prevent diabetes-induced alterations of mitochondrial morphology in rat embryos. *Anat Rec* 251:303-315.
- Zangen SW, Yaffe P, Shechtman S, Zangen DH, Ornoy A (2002) The role of reactive oxygen species in diabetes-induced anomalies in embryos of Cohen diabetic rats. *Int J Exp Diabetes Res* 3:247-255.
- Zhao GQ, Zhao Q, Zhou X, Mattei MG, de Crombrughe B (1993) TFEC, a basic helix-loop-helix protein, forms heterodimers with TFE3 and inhibits TFE3-dependent transcription activation. *Mol Cell Biol* 13:4505-4512.

- Zhao Q, Behringer RR, de Crombrughe B (1996) Prenatal folic acid treatment suppresses acrania and meroanencephaly in mice mutant for the *Cart1* homeobox gene. *Nat Genet* 13:275-283.
- Zhao R, Assaraf YG, Goldman ID (1998) A mutated murine reduced folate carrier (RFC1) with increased affinity for folic acid, decreased affinity for methotrexate, and an obligatory anion requirement for transport function. *J Biol Chem* 273:19065-19071.
- Zhu Y, Casado M, Vaulont S, Sharma K (2005) Role of upstream stimulatory factors in regulation of renal transforming growth factor-beta1. *Diabetes* 54:1976-1984.
- Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, Mann J, Vassileva G, McMahon A (1994) Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 12:11-24.
- Zohn IE, Sarkar AA (2008) Modeling neural tube defects in the mouse. *Curr Top Dev Biol* 84:1-35.
- Zohn IE, Anderson KV, Niswander L (2007) The Hectd1 ubiquitin ligase is required for development of the head mesenchyme and neural tube closure. *Dev Biol* 306:208-221.
- Zuniga A, Quillet R, Perrin-Schmitt F, Zeller R (2002) Mouse Twist is required for fibroblast growth factor-mediated epithelial-mesenchymal signalling and cell survival during limb morphogenesis. *Mech Dev* 114:51-59.

ANEXO I:
Publicaciones
derivadas de la Tesis



Alx3-deficient mice exhibit folic acid-resistant craniofacial midline and neural tube closure defects

Sita Lakhwani^{a,1}, Patricia García-Sanz^{a,b,1}, Mario Vallejo^{a,b,*}

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad Autónoma de Madrid, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas CIBERDEM, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received for publication 4 September 2009

Revised 1 June 2010

Accepted 1 June 2010

Available online 8 June 2010

Keywords:

Homeodomain

aristaless

Folic acid

Neural tube

Craniofacial development

Alx3 promoter

Transcription

ABSTRACT

Neural tube closure defects are among the most frequent congenital malformations in humans. Supplemental maternal intake of folic acid before and during pregnancy reduces their incidence significantly, but the mechanism underlying this preventive effect is unknown. As a number of genes that cause neural tube closure defects encode transcriptional regulators in mice, one possibility is that folic acid could induce the expression of transcription factors to compensate for the primary genetic defect. We report that folic acid is required in mouse embryos for the specific expression of the homeodomain gene *Alx3* in the head mesenchyme, an important tissue for cranial neural tube closure. *Alx3*-deficient mice exhibit increased failure of cranial neural tube closure and increased cell death in the craniofacial region, two effects that are also observed in wild type embryos developing in the absence of folic acid. Folic acid cannot prevent these defects in *Alx3*-deficient embryos, indicating that one mechanism of folic acid action is through induced expression of *Alx3*. Thus, *Alx3* emerges as a candidate gene for human neural tube defects and reveals the existence of induced transcription factor gene expression as a previously unknown mechanism by which folic acid prevents neural tube closure defects.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The formation of the neural tube during the early stages of neural development, known as neurulation, occurs by apposition and fusion of the neural folds, which arise and elevate from both sides of the neural plate. Closure of the neural tube during neurulation is a complex process that is initiated at different contact points both in mice and in humans (Copp et al., 2003; De Marco et al., 2006; O’Rahilly and Muller, 2002). When this process fails, the neural tube remains partially open and congenital neural tube defects (NTD) develop. There are different types of NTD depending on the location of the defect, including acrania and anencephaly at the cranial level, and spina bifida at the spinal level. In humans, NTD represent an important group of congenital disorders with a relatively high incidence.

The molecular bases of NTD in humans are largely unknown. Environmental factors appear to be important, but accumulating evidence indicates the existence of a strong genetic component. In recent years, the development of mouse models with NTD has led to the identification of a relatively large number of genes that are important for neural tube closure (Copp et al., 2003; Harris and

Juriloff, 2007). Although these studies provide an impressive list of candidate genes possibly involved in abnormal neurulation in humans, with few exceptions (Kibar et al., 2007b) clinical studies have failed to establish etiological associations between NTD and mutations in any of the homologous human genes (Kibar et al., 2007a).

It is now well established that folic acid supplementation to women during their child-bearing age can decrease the incidence of NTD up to 70% (Czeizel and Dudas, 1992; Wald et al., 1991), but the mechanism of action of this vitamin on the prevention of defective neural tube closure is not known (Blom et al., 2006). In mouse models, disruption of the genes encoding folic acid binding protein 1 (Folbp1) or reduced folate carrier 1 (RFC1) causes NTD, (Gelineau-van Waes et al., 2008; Piedrahita et al., 1999). In both cases, maternal supplementation with folic acid rescues the defect, underscoring the importance of efficient transport of folates into cells for normal development. Interestingly, disruption of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase, a key enzyme in folate metabolism, does not result in the appearance of NTD (Chen et al., 2001). In humans, it has been proposed that the etiological basis of NTD responds to a multifactorial model in which both genetic and environmental factors interact in a complex manner (Harris and Juriloff, 2007; Zohn and Sarkar, 2008).

In some mouse models, the disruption of genes encoding transcriptional regulators such as Pax3, Cart1 and Cited2 results in the development of NTD that can be rescued by maternal folate

* Corresponding author. Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, Calle Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain. Fax: +34 91 585 4401.

E-mail address: mvallejo@iib.uam.es (M. Vallejo).

¹ S.L. and P.G.S. contributed equally to this work.